

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

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

**PROGRAMA DE DOCTORADO:
CLÍNICA E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA**



**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS
RECEPTORES NUCLEARES LXR EN LA ACTIVACIÓN Y
MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Memoria para optar al grado de DOCTOR presentada por

Susana Beceiro Casas

Susana Beceiro Casas

Fdo.: El Doctorando

Dr. Antonio Castrillo Viguera

Fdo.: El Director

Dr. C. M. Ruiz de Galarreta

Fdo.: El Codirector

Dr. Félix López Blanco

Fdo.: El Codirector

Las Palmas de Gran Canaria a 3 de Mayo de 2011



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
BIOLOGÍA MOLECULAR
Y FISIOLOGÍA**

Facultad de Medicina. Centro de Ciencias de la Salud

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ULPGC

El trabajo experimental de la presente memoria fue desarrollado por Dña. Susana Beceiro Casas en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la Facultad Medicina, Centro de Ciencias de la Salud, en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC).

Arriesgarse, sigue siendo la mejor manera de lograr algo en la vida

A mis padres

A mi hermano

Agradecimientos

Quisiera agradecer a Antonio Castrillo todo lo que me ha enseñado y transmitido durante estos años, a quien debo mi formación investigadora y la realización de este trabajo. Te agradezco me hayas contagiado de tu espíritu científico.

Me gustaría agradecer también a Carlos Manuel Ruiz Galarreta y a Félix López sus consejos y propuestas realizados a lo largo de esta tesis.

Por último, quiero expresar mi mayor gratitud a todas las personas que están dentro y fuera del mundo de la investigación, que con su amistad, apoyo y conocimientos han contribuido, directa o indirectamente, no sólo a la consecución de este trabajo, sino también a la sonrisa y felicidad del día a día. A todos vosotros, a los que nombraros sobra, deciros que sois estupendos.

ÍNDICE

ÍNDICE ESQUEMÁTICO

• ABREVIATURAS	1
• INTRODUCCIÓN	7
• OBJETIVOS	71
• MATERIAL Y MÉTODOS	75
• RESULTADOS	107
• DISCUSIÓN	175
• CONCLUSIONES	193
• BIBLIOGRAFÍA	197

ÍNDICE

DETALLADO

• ABREVIATURAS	1
• INTRODUCCIÓN	7
1. El sistema inmune	9
1.1. Componentes celulares del sistema inmune	9
1.2. La inmunidad Innata	10
1.3. La inmunidad Adquirida	11
1.4. La inflamación	12
1.5. Los órganos linfoides	13
2. Las Células Dendríticas	17
2.1. Tipos de Células Dendríticas	18
2.1.1. Células dendríticas convencionales	19
2.1.2. Células dendríticas plasmacitoides	20
2.1.3. Células dendríticas derivadas de monocitos o inflamatorias	21
2.2. Origen y desarrollo de las células dendríticas	23
2.3. Citoquinas implicadas en el desarrollo de las células dendríticas	25
2.4. Ciclo de vida de las Células Dendríticas	27
2.5. Características de las células dendríticas	31
2.5.1. Reconocimiento y procesamiento de antígenos por parte de las células dendríticas inmaduras	31

2.5.2. Relación entre la captación y presentación de antígenos: maduración de las células dendríticas	32
2.5.3. Procesamiento y presentación de antígenos por las células dendríticas maduras	34
2.6. Células Dendríticas y Tolerancia inmunológica	35
2.7. Migración de las células dendríticas	37
2.7.1. Moléculas implicadas en la migración de las células dendríticas: QUIMIOQUINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS	37
2.7.2. Tráfico de la célula dendrítica hacia los ganglios linfáticos: MIGRACIÓN MEDIADA POR CCR7	42
2.7.3. Vías de señalización reguladas por CCR7: modelo “multimodular”	44
2.7.4. Otras vías de señalización implicadas en la migración de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos	46
3. RECEPTORES NUCLEARES	49
3.1. La superfamilia de los receptores nucleares	49
3.2. Estructura de los receptores nucleares	50
3.3. Mecanismos de unión de los receptores nucleares a ADN	52
3.4. Mecanismos de activación y represión transcripcional	53
4. RECEPTORES X HEPÁTICOS (LIVER X RECEPTORS, LXR)	56
4.1. LXR: isoformas, ligandos y distribución	56
4.2. Principales funciones de LXR	57
4.2.1. Implicación de LXR en el metabolismo lipídico	57
4.2.2. LXR y aterosclerosis	61
4.2.3. LXR e inflamación	62
4.2.4. LXR e inmunidad innata	64

4.2.5. LXR en la inmunidad adquirida	66
5. PAPEL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	67
• OBJETIVOS	71
• MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. Animales de experimentación	77
2. Cultivo de líneas celulares y transfecciones	77
2.1. Cultivo de células dendríticas	77
2.1.1. Obtención y diferenciación de células dendríticas derivadas de progenitores procedentes de médula ósea de ratón	77
2.1.2. Obtención de células dendríticas a partir de bazo de ratón	79
2.1.3. Transfección de células dendríticas	80
2.2. Cultivo de la línea celular mieloide RAW264.7	81
3. Histología	81
3.1. Recogida y conservación de muestras	81
3.2. Obtención de criosecciones	82
4. Análisis de la expresión de proteínas	82
4.1. Análisis de la expresión de proteínas en células intactas por citometría de flujo	84
4.2. Análisis de la expresión de proteínas en células en cultivo: Inmunocitoquímica	85
4.3. Tinción inmunorreactiva en tejidos: Inmunofluorescencia en cortes de tejidos congelados	86

4.4. Estudio de las interacciones proteína:ADN mediante ensayo de retardo en gel (EMSA)	88
4.5. Inmunoprecipitación de proteínas mediante ChIP	90
4.5.1. Cultivo, tratamiento y fijación de las células	91
4.5.2. Preparación de los extractos de cromatina	92
4.5.3. Inmunoprecipitación	92
4.6. Estudio de las proteínas por <i>Western-Blot</i>	94
4.6.1. Preparación de los extractos proteicos	94
4.6.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)	95
4.6.3. Análisis de expresión proteica mediante <i>Western-Blot</i>	95
5. Estudio de la capacidad endocítica de las células dendríticas frente al antígeno dextrano	97
6. Análisis de la expresión de ARN	98
6.1. Extracción de ARN	98
6.2. Análisis de ARN mensajero por RT-qPCR	98
6.3. Estudio de perfil transcripcional por análisis de microarrays	101
7. Estudio del tráfico de las células dendríticas	101
7.1. Análisis de la capacidad migratoria	101
7.1.1. Ensayo " <i>FITC skin painting</i> ": sensibilización <i>in vivo</i> de la piel	102
7.1.2. Ensayo de migración <i>in vivo</i>	102
7.2. Ensayos de quimiotaxis <i>in vitro</i>	103
8. Análisis estadístico	105
• RESULTADOS	107

1. Caracterización de la actividad de los receptores LXR en células dendríticas	109
1.1. Análisis del proceso de diferenciación y maduración de las células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ -/-	109
1.2. Caracterización fenotípica de células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ -/-	114
2. Caracterización de los receptores nucleares LXR en células dendríticas	115
2.1. Estudio de la expresión de las isoformas LXR α y LXR β en células dendríticas	118
2.2. Estudio de la actividad transcripcional de LXR en células dendríticas	119
3. Análisis de las poblaciones celulares de los órganos linfoides secundarios de ratones WT y LXR$\alpha\beta$-/-	121
4. Análisis de la funcionalidad de las células dendríticas LXR$\alpha\beta$-/-	125
4.1. Estudio de captación de antígenos <i>in vitro</i> por parte de células dendríticas	125
4.2. Análisis de la capacidad migratoria de células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/-	127
4.2.1. Análisis de la migración <i>in vivo</i> de células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ -/-	128
4.2.2. Defecto en la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/-	130
4.2.3. Defecto en la migración <i>in vivo</i> de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/-	139

5. Análisis de la expresión y vías de señalización de CCR7 en células dendríticas WT y LXR$\alpha\beta$-/-	141
6. Actividad transcripcional de los receptores LXR en células dendríticas: análisis de microarrays	147
6.1. Análisis de genes dependientes de la activación de células dendríticas	148
6.2. Estudio de la regulación de genes en células dendríticas tras la activación de los receptores LXR	152
6.3. La expresión de CD38 en células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/- está disminuida	154
7. Regulación de la expresión de CD38 por heterodímeros LXR/RXR	161
7.1. Análisis del promotor de CD38	164
7.2. CD38 contribuye al defecto migratorio y quimiotáctico observado en células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/-	169
• DISCUSIÓN	175
• CONCLUSIONES	193
• BIBLIOGRAFÍA	197

ABREVIATURAS

ABC	Familia de transportadores de membrana de unión a ATP tipo "Cassette"
AF	Dominio de función activadora
AP	Proteína activadora
Api6	Inhibidor de la apoptosis en macrófagos
Apo	Apolipoproteína
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APC	Células presentadoras de antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BMDC	Bone marrow-derived dendritic cell
8-Br-cADPR	8-Bromo-cyclic adenosine diphosphate ribose
BSA	Albúmina de suero bovino
cADPR	Adenosina difosfato ribosa cíclica
CCL	Ligando de quimioquinas C-C
CCR	Receptor de quimioquinas C-C
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDC	Células dendríticas convencionales
CETP	Proteína transportadora de ésteres de colesterol,
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CMFDA	5-clorometilfluoresceína diacetato
CMH	Células madre hematopoyéticas
COX	Ciclooxigenasa
CXCL	Ligando de quimioquinas CX
CXCR	Receptor de quimioquinas CX
Cyp7a1	Citocromo P450, familia 7, subfamilia A, polipéptido 1
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DBD	Dominio de unión a ADN
DC	Célula dendrítica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	Repetición directa
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ED	Expresión diferencial
EDTA	Etilendiamino tetraacetato sódico
ELC	<i>Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine</i>
EMSA	Ensayo de retardo en gel
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAS	Sintasa de ácidos grasos

FBS	Suero fetal bovino
FC	Citometría de flujo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLT3L	<i>FMS-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
FSC	Tamaño (<i>forward scatter</i>)
FXR	Receptores X de farnesoide
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
GLUT	Transportador de glucosa
GuSCN	<i>Guanidinium isothiocyanate</i>
HDAC	De-acetilasa de histona
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEV	Vénulas endoteliales poscapilares
HRE	Elemento de respuesta hormonal
HSP	Proteínas de choque térmico
ICQ	Inmunocitoquímica
iDC	Células dendríticas inmaduras
IF	Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IRF	Factor regulador del interferón
JNK	<i>c-jun n-terminal kinase</i>
LBD	Dominio de unión a ligando
LC	Células de Langerhans
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LP	Lámina propia
LPL	Lipoproteína lipasa
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LXR	Receptores X hepáticos
LXRE	Elemento de respuesta a LXR
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
mDC	Células dendríticas maduras
MHC	Complejo mayor de Histocompatibilidad
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MMP	Metalopeptidasa de matriz
NAADP	<i>Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate</i>
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido

N-CoR	Proteína co-represora de receptores nucleares
NF-κB	Factor nuclear kappa de células B
NK	<i>Natural Killer</i>
oxLDL	Lipoproteínas oxidadas de baja densidad
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PCDC	Precusores comunes de células
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinasa
PLTP	Proteína transportadora de fosfolípidos
PMDC	Progenitores de macrófagos/células dendríticas
PPAR	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
PRR	Receptor de reconocimiento de patógenos
R7DTM	Receptores con siete dominios transmembranales
RANTES	<i>Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>
RPMI	Medio de cultivo celular desarrollado en <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RXR	Receptores X de retinoico
SCS	Seno subcapsular
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SLC	<i>Secondary lymphoid organ chemokine</i>
SMRT	Proteína silenciadora de receptores de retinoico y hormona tiroidea
SREBP-1c	Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides 1c
SSC	Complejidad (<i>side scatter</i>)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBE	Tris-borato EDTA
TECK	<i>Thymus-expressed chemokine</i>
Th	Linfocitos T colaboradores
Tip-DC	<i>TNF-α and iNOS-producing dendritic cells</i>
TLR	Receptor tipo <i>Toll</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>
TREM	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPM2	<i>Transient receptor potential cation channel member 2</i>

VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WB	<i>Western-Blot</i>
WT	Estirpe salvaje

INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA INMUNE

A lo largo de la evolución, los organismos superiores han desarrollado un complejo y eficaz entramado de órganos, tejidos y células que protege al individuo frente a microorganismos patógenos. Los seres vivos no sólo están permanentemente expuestos a las agresiones de microorganismos potencialmente dañinos como virus, bacterias hongos y parásitos, sino también al desarrollo de células neoplásicas, y es este sistema altamente organizado denominado sistema inmune el que garantiza la defensa de los organismos y la supervivencia de las especies.

Clásicamente, el sistema inmune se ha subdividido de forma funcional en inmunidad innata (o natural) e inmunidad adquirida (o adaptativa). La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa del organismo, especialmente efectiva y rápida contra agentes infecciosos y agresiones físicas. En caso de que los microorganismos atraviesen esta primera barrera de defensa innata, se inicia en los organismos superiores la respuesta inmune adaptativa, mucho más específica y sostenida.

1.1. Componentes celulares del sistema inmune

Las células que componen el sistema inmune se denominan genéricamente leucocitos o células blancas. Los leucocitos se subdividen en dos categorías principales: los linfocitos y los fagocitos, que incluyen granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, macrófagos y células dendríticas. Los linfocitos se subdividen a su vez en tres ramas: los linfocitos T, los linfocitos B y las células NK (*Natural Killer*). Los linfocitos T también se encuentran subdivididos

en dos subtipos, los linfocitos T CD4⁺ o Th (T *helper*, cooperador), y los linfocitos T CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos. Todas las células del sistema inmune se originan en la médula ósea y se encuentran circulando por el torrente circulatorio, ubicadas en órganos linfoides o dispersas en otras localizaciones del cuerpo.

1.2. La Inmunidad Innata

Los elementos más antiguos del sistema de defensa innato son las barreras físicas y químicas, como la piel y el bajo pH del estómago. Si los microorganismos son capaces de atravesar estas barreras, se activan los mecanismos de defensa en forma de células fagocíticas, como macrófagos y neutrófilos, capaces de ingerir y destruir material extraño. De este modo, esta respuesta innata en mamíferos está en gran parte mediada por células epiteliales, neutrófilos, macrófagos, células NK, células dendríticas, citoquinas y factores del complemento, y se caracteriza por ser inespecífica, de vida corta, y desencadenada por receptores expresados en esas células. Éstos se denominan receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*), encargados de reconocer los “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, *Pathogen-associated Molecular Patterns*), como lipopolisacárido bacteriano (LPS), carbohidratos, ARN vírico de doble cadena, estructuras moleculares que están presentes y frecuentemente comparten grandes grupos de microorganismos, pero no están presentes en el hospedador. El reconocimiento de estas estructuras permite al sistema inmune distinguir agentes infecciosos extraños de agentes propios no infecciosos.

1.3. La Inmunidad Adquirida

La evolución de los vertebrados ha provocado cambios en los microorganismos que les permiten atravesar los sistemas de defensa, por lo que se requiere una respuesta sostenida, específica y de vida larga, y como resultado de estos cambios surge el sistema inmune adaptativo. Se trata de una respuesta más lenta y que generalmente se denomina respuesta inmune específica, porque las moléculas blanco de su acción suelen ser patógenos específicos. Mientras que el sistema inmune innato responde a estructuras que comparten distintos grupos de microbios, el sistema inmune adaptativo responde a antígenos que son específicos de cada patógeno. Esta respuesta inmune adaptativa se desarrolla a lo largo de la vida de un individuo al enfrentarse a antígenos, se demora en el tiempo, pero proporciona una especificidad mayor, además de memoria inmunológica (Banchereau et al., 2000). La respuesta inmune adaptativa, sin embargo, no puede ser iniciada sin la intervención de las células del sistema innato.

Los principales participantes de la respuesta adaptativa son los linfocitos B y T. Los linfocitos T interactúan con células del sistema inmune innato y producen linfocitos T efectores, que ejercen diferentes funciones, como la secreción de citoquinas y la activación de otras células inmunitarias, como los linfocitos B. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos, capaces de neutralizar y aumentar la fagocitosis de los microbios.

La capacidad del sistema inmune para generar una respuesta efectiva y duradera contra los microorganismos depende de la acción coordinada de los sistemas inmunes innato y adaptativo. Instantes después de la infección, la

respuesta inmune innata no sólo limita el establecimiento de los patógenos, sino que también informa al sistema inmune adaptativo sobre la naturaleza del patógeno.

1.4. La inflamación

La inflamación es una respuesta inmediata del cuerpo frente a diversos estímulos, como infección, heridas, determinadas enfermedades, etc. Se caracteriza por enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor. Esto ocurre como resultado de un incremento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad de los capilares sanguíneos. Esto último es necesario para permitir a grandes moléculas (como complemento, anticuerpos o citoquinas) abandonar el torrente sanguíneo, cruzar la barrera endotelial e incrementar el movimiento de los leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta los tejidos adyacentes. Por ello, la inflamación es una parte más de la respuesta inmune innata normal.

Tanto la respuesta inmune innata como la adquirida interaccionan mediante contactos directos célula a célula, y mediante las citoquinas que se producen a partir de un determinado estímulo. La respuesta innata, incluyendo su componente inflamatorio, reacciona inicialmente frente al estímulo, actuando directamente para eliminarlo mediante las actividades del complemento y de la fagocitosis. Las citoquinas producidas por las células involucradas en la respuesta innata, especialmente por los monocitos y los macrófagos, regulan esta respuesta y también actúan sistémicamente en el hígado, promoviendo la síntesis de proteínas de fase aguda. En el músculo esquelético y tejido adiposo inducen la proteólisis y la lipólisis, respectivamente. Se cree que éste es el modo en que el cuerpo proporciona “combustible” al sistema inmune para que actúe. En el

cerebro se reduce el apetito e inducen fiebre. Los antígenos además de ser fagocitados para su eliminación, también lo son para su posterior presentación a otras células del sistema inmune.

1.5. Los órganos linfoides

Los órganos linfoides se dividen en dos grandes grupos, en base a su funcionalidad: primarios y secundarios.

En los órganos linfoides primarios, médula ósea y timo, tiene lugar la formación de células inmunocompetentes capaces de llevar a cabo su función inmunológica, mientras que en los órganos linfoides secundarios, ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados a superficies mucosas, se lleva a cabo la respuesta inmunológica frente a los antígenos. La médula ósea se caracteriza por ser simultáneamente órgano linfoide primario, por su función hematopoyética, y secundario, por ser el lugar donde ocurre la diferenciación final de linfocitos B a linfocitos B plasmáticos. En el timo tiene lugar la diferenciación de los linfocitos T, proceso necesario para adquirir la capacidad de distinguir lo propio de lo no-propio.

Órganos linfoides secundarios: Bazo y ganglios linfáticos

El bazo y los ganglios linfáticos son los órganos linfoides secundarios con el mayor grado de organización, y se encuentran localizados de forma estratégica para poder realizar su función de manera eficiente. La estructura de los distintos órganos linfoides secundarios es semejante entre sí. Incluyen folículos linfoides, que son agregados de células linfoides y no linfoides rodeados por una red de capilares de drenaje. No obstante, a diferencia de los tejidos linfoides asociados a

mucosas, en bazo y ganglios linfáticos existen regiones precisas para la activación de linfocitos B y T, y son órganos rodeados por una cápsula fibrosa.

El bazo constituye uno de los principales filtros de sangre del cuerpo, por lo que se erige como un órgano necesario para la captura de antígenos, permitiendo a las células del sistema inmune innato y adaptativo responder rápidamente contra patógenos presentes en sangre. El bazo está rodeado de una cápsula fibrosa desde la que sobresalen trabéculas hacia el interior del tejido, proporcionando soporte para el órgano y su vascularización (Mebius and Kraal, 2005). Los vasos sanguíneos entran en el bazo a través del hilio y se ramifican en arteriolas centrales, rodeadas por compartimentos linfoides organizados denominados pulpa blanca. Estas ramificaciones de las arteriolas centrales terminan en la zona marginal, encargada de formar la interfase entre pulpa roja y pulpa blanca del bazo. En la pulpa roja tiene lugar el filtrado de la sangre, gracias a la especial disposición de los vasos sanguíneos y las células reticulares, y el reciclado de hierro debido principalmente a los macrófagos de la pulpa roja F4/80⁺. En ratones, la pulpa esplénica blanca consiste en zonas de linfocitos T, rodeando una arteriola central, folículos de linfocitos B asociados y la zona marginal que los rodea.

Las zonas de linfocitos T en el bazo contienen linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y diferentes subtipos de células dendríticas. Estas células se sostienen gracias a una red de células estromales conocidas como células reticulares fibroblásticas. En los folículos de linfocitos B, éstos se apoyan en una red de células dendríticas foliculares, y una red más difusa de otras células estromales. Las células estromales de la zona marginal, particularmente la que rodea los folículos de linfocitos B, presentan características únicas y representan un subtipo

especializado de células estromales conocidas como células reticulares marginales (Katakai et al., 2008). La zona marginal contiene macrófagos de la zona marginal, macrófagos metalofílicos que expresan CD169 (receptor para la proteína sialoadhesina), subtipos de células dendríticas, y linfocitos B de la zona marginal, en medio de una densa red de células del estroma. Los patógenos, antígenos y partículas que entran en el bazo desde la sangre son captados por los fagocitos de la zona marginal. Los linfocitos B y las células dendríticas de la zona marginal migran hacia la pulpa blanca, donde entregan o presentan los antígenos a los linfocitos B y T, respectivamente (Cinamon et al., 2008; Mebius and Kraal, 2005) (Figura I).

Los ganglios linfáticos se encuentran ampliamente distribuidos por el cuerpo, y presentan una estructura interna característica que permite el reconocimiento y transporte de los antígenos para la generación de la respuesta inmune. Éstos también son órganos linfoides encapsulados, encargados de recibir el filtrado de fluido extracelular (linfa) a través de una serie de vasos no hematógenos (vasos linfáticos), que drenan los tejidos y órganos del cuerpo. Inmediatamente bajo la cápsula del ganglio linfático se encuentra el seno subcapsular (SCS), a través del que los vasos linfáticos aferentes descargan moléculas como antígenos, microorganismos y células, como linfocitos y células presentadoras de antígenos (APC, *Antigen Presenting Cell*), desde los tejidos. Los macrófagos se alinean en el SCS y fagocitan antígenos y partículas que entran en el ganglio a través de la linfa (Drinker et al., 1934), de manera similar a lo que hacen los macrófagos en la zona marginal del bazo. Los linfocitos principalmente entran desde la sangre a través de vénulas endoteliales poscapilares especializadas (HEV, *high endothelial venules*) (Anderson and Anderson, 1975), que se suelen organizar en regiones entre las zonas de linfocitos T y linfocitos B (Katakai et al., 2004). De

manera similar a lo que sucede en el bazo, las zonas de linfocitos T contienen linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y subtipos de células dendríticas, sostenidas en una red de fibras reticulares. Por otro lado, los folículos de linfocitos B contienen células foliculares dendríticas y un complejo sistema de células estromales en la periferia, que bordea las zonas de linfocitos T y SCS. Las células estromales que se encuentran entre los folículos de linfocitos B y el SCS tienen propiedades únicas que las distinguen como células reticulares marginales, de forma similar a lo que ocurre en el bazo (Katakai et al., 2008) (Figura I).

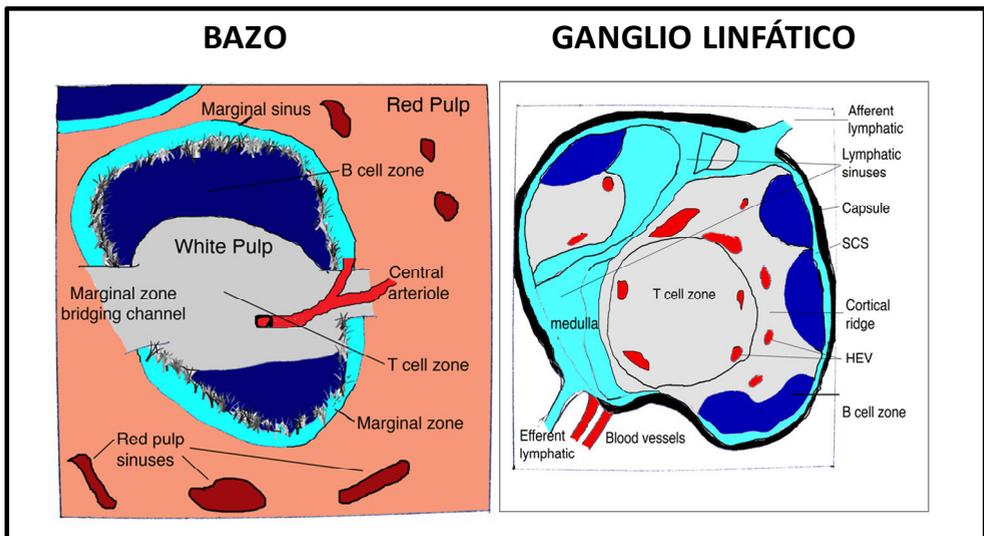


Figura I.- Representación esquemática de la organización del bazo (panel de la izquierda) y ganglio linfático (panel de la derecha). Adaptado de (Mueller and Germain, 2009).

Por todo ello, la microanatomía de los órganos linfoides secundarios define la habilidad de un organismo para responder frente a patógenos, siendo esta microarquitectura al mismo tiempo muy adaptable a cambios ambientales. Los órganos linfoides secundarios cumplen tres funciones en su lucha contra las

infecciones. Se encargan de reducir la diseminación de patógenos mediante su captura por macrófagos estratégicamente localizados (Junt et al., 2007; Ochsenbein et al., 1999), y mediante la producción de mediadores inmunes innatos, como los interferones de tipo I (IFN-1) (Cervantes-Barragan et al., 2007). Estos órganos ponen en contacto las APC con linfocitos específicos de patógenos para inducir una eficiente respuesta inmune (Mempel et al., 2004; Stoll et al., 2002). Por último, los órganos linfoides secundarios proporcionan los factores necesarios para la supervivencia y diferenciación de los linfocitos (Schluns and Lefrancois, 2003).

2. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas fueron descritas por primera vez por Paul Langerhans (Langerhans P., 1868), quien las identificó en la piel hace más de un siglo como “células con proyecciones en su superficie similares a las dendritas de las neuronas”. Estas células de la piel se denominaron células de Langerhans (LC, *Langerhans cells*) y durante mucho tiempo se consideró que pertenecían al sistema nervioso. En 1973, Steinman y Cohn describieron una población de células nuevas con similares propiedades en los órganos linfoides (Steinman and Cohn, 1973). Al mismo tiempo, dos grupos independientes describieron la expresión del antígeno “Ia” en LC, así como su capacidad para presentar antígenos (Klareskog et al., 1977; Rowden et al., 1977). Desde entonces, se ha publicado gran cantidad de información sobre la inmunobiología de estas células.

Las células dendríticas constituyen una población de células que comprende sólo el 1% de las células presentes en los órganos linfoides periféricos. Poseen propiedades que las convierten en células idóneas para la captura y

presentación de antígenos y posterior polarización de linfocitos T. En primer lugar, actúan como centinelas conformando una extensa red entrelazada bajo las superficies epiteliales, sitios clave de entrada de patógenos al organismo, y además poseen diferentes PRR y receptores endocíticos, que les permiten detectar la presencia de patógenos, y emitir la señal de alerta al sistema inmune. En segundo lugar, aunque diferentes tipos celulares expresan moléculas del complejo mayor de Histocompatibilidad clase I y II (MHC, *major histocompatibility complex*, I y II), necesarias para la presentación de antígenos, las células dendríticas parecen ser el único tipo celular que puede activar eficientemente linfocitos T *naive* (Belz et al., 2006; Jung et al., 2002; Zammit et al., 2005). Y en tercer lugar, las células dendríticas, además de tener capacidad para captar antígenos, también poseen la maquinaria especializada en el procesamiento y presentación eficientes de éstos, así como niveles elevados de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T. Por todo ello, entre las APC, las células dendríticas representan un sistema único como sensores de patógenos invasores.

2.1. Tipos de Células Dendríticas

Las células mieloides se han caracterizado por su gran heterogeneidad, por lo que permanece abierto un debate científico acerca de la confusión que existe en la diferenciación entre macrófagos y células dendríticas. Parte de esta confusión se debe al uso de marcadores de superficie no completamente específicos, como CD11c, hecho que ha llevado a utilizar el nombre de célula dendrítica para designar diferentes tipos celulares, como los monocitos activados, los macrófagos tisulares e incluso algunas células NK y eosinófilos. Aunque experimentos recientes llevados a cabo *in vivo* en ratones han incrementado el conocimiento del desarrollo y funciones de los diferentes subtipos de células dendríticas (Fogg et al., 2006; Geissmann et al., 2010b; Liu et al., 2009; Naik et al.,

2007; Onai et al., 2007), los correspondientes subtipos de células dendríticas no están totalmente caracterizados en humanos. De este modo, las células dendríticas constituyen una población de células heterogénea, que son fenotípicamente descritas en base a diversos marcadores de superficie.

2.1.1. Células dendríticas convencionales

Las células dendríticas convencionales se pueden subdividir según su origen en células dendríticas migratorias, localizadas en los tejidos periféricos, como piel y mucosas, y células dendríticas residentes en tejidos linfoides, que parecen no migrar fuera de los órganos linfoides, sino que se desarrollan *in situ* y completan su ciclo de vida dentro de los mismos.

Células dendríticas migratorias

Las células dendríticas migratorias derivan de células precursoras que se desarrollan en los tejidos, o bien tras la circulación desde la médula ósea. Estas células viajan hasta los ganglios linfáticos locales a través de los vasos linfáticos. Son las células dendríticas clásicas que actúan como centinelas frente a antígenos en tejidos periféricos, con capacidad para migrar en respuesta a señales de peligro, aunque también existe cierta migración en condiciones basales. Las LC son el prototipo de este subtipo de célula dendrítica, que se encuentran en el epitelio escamoso de la piel, así como en el epitelio del intestino, tractos respiratorio y reproductivo. Es probable que la mayoría de las células dendríticas localizadas en los tejidos periféricos no linfoides, así como las células dendríticas dérmicas e intersticiales, pertenezcan a este grupo. Estas células suelen presentar un fenotipo maduro al llegar a los ganglios linfáticos, con una disminución de la capacidad para captar antígenos.

Células dendríticas residentes en tejidos linfoides

Al contrario que las células dendríticas migratorias, estas células dendríticas residen en los tejidos linfoides y no migran hacia los órganos linfoides desde los vasos linfáticos, sino que capturan y presentan antígenos en el propio órgano linfoide. Las células dendríticas residentes en los tejidos linfoides engloban aproximadamente la mitad de las células dendríticas que se encuentran en los ganglios linfáticos (Henri et al., 2001; Wilson et al., 2003) y son la mayoría de las células dendríticas que se hallan en bazo (Vremec et al., 2000) y timo (Ardavin, 1997). Las células dendríticas residentes en ganglios linfáticos y bazo de ratones se caracterizan por la expresión del marcador CD11c, y se pueden subdividir, basándose en la expresión diferencial del co-receptor de linfocitos T CD8, en células dendríticas CD8⁺ y células dendríticas CD8⁻ (Vremec et al., 2000; Vremec et al., 1992). Ambas poblaciones de células difieren en las funciones inmunes, incluyendo la producción de citoquinas (Hochrein et al., 2001; Reis e Sousa et al., 1997) y la presentación de antígenos en las moléculas MHC (Heath et al., 2004; Pooley et al., 2001). Las células dendríticas CD8⁻ pueden subdividirse a su vez en células dendríticas CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁻ (Vremec et al., 2000). En contraposición con las células dendríticas migratorias, estas células dendríticas presentan un fenotipo inmaduro y son activas en la captación y procesamiento de antígenos.

2.1.2. Células dendríticas plasmacitoides

Las células dendríticas plasmacitoides se describieron originalmente como células dotadas de capacidad para liberar rápidamente IFN- α durante las infecciones víricas (Grouard et al., 1997), y presentan una vida media más larga que las células dendríticas convencionales. Estas células están presentes en la médula ósea y en todos los órganos periféricos, y en condiciones basales parecen

ser relativamente inmaduras, con escasa expresión de moléculas co-estimuladoras y de moléculas MHC clase II (Liu, 2005; O'Keeffe et al., 2002). Estas células dendríticas están especializadas en responder frente a infecciones víricas con una producción masiva de IFN, aunque también pueden actuar como APC, controlando la respuesta de los linfocitos T (Colonna et al., 2004).

2.1.3. Células dendríticas derivadas de monocitos o inflamatorias

Recientemente se han definido nuevas poblaciones de células dendríticas que no se encuentran en condiciones basales, y que probablemente sea debido a infecciones o inflamación. Es el caso de las células dendríticas derivadas de monocitos que producen grandes cantidades del factor de necrosis tumoral (TNF, *Tumor Necrosis Factor*) y óxido nítrico, denominadas Tip-DC (*TNF- α and iNOS-producing dendritic cells*) (Narni-Mancinelli et al., 2007; Serbina et al., 2003). Estas células se desarrollan en ratones a partir de monocitos GR1⁺ durante la infección con ciertas bacterias, como *Listeria monocytogenes*, o tras el daño producido en miocardio.

2.2. Origen y desarrollo de las células dendríticas

Después de su caracterización inicial (Steinman and Cohn, 1973), se sabe que las células dendríticas juegan un papel iniciador clave en la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, permanece sin dilucidar completamente el origen y las señales de diferenciación necesarias para la generación de los diferentes subtipos de células dendríticas en ratón, y sus correspondientes poblaciones celulares en humanos, así como su correcta diferenciación en macrófagos y monocitos.

Modelos recientes proponen que los monocitos de sangre, varios subtipos de macrófagos y la mayoría de las células dendríticas se originan *in vivo* a partir de progenitores derivados de células madre hematopoyéticas con un potencial de diferenciación con restricción mieloide (Figura II). Sucesivos pasos que se producen en la médula ósea dan lugar a los progenitores mieloides comunes, precursores de granulocitos-macrófagos, y progenitores de macrófagos/células dendríticas (PMDC). Estos PMDC son un subtipo de células proliferativas que comparten características fenotípicas con poblaciones de precursores mieloides, y que dan lugar a los diferentes subtipos de macrófagos y células dendríticas (Fogg et al., 2006) pero que, sin embargo, no pueden diferenciarse en gran parte en granulocitos u otro tipo celular del linaje mieloide. Así, dentro de la médula ósea, los PMDC se diferencian en monocitos y en los precursores comunes de células dendríticas (PCDC). Los PCDC son células proliferativas que se diferencian, a su vez, en células dendríticas plasmacitoides y en los precursores de las células dendríticas convencionales (pre-cDC) en la médula ósea, pero que han perdido la capacidad para generar monocitos (Liu et al., 2009; Naik et al., 2007; Onai et al., 2007).

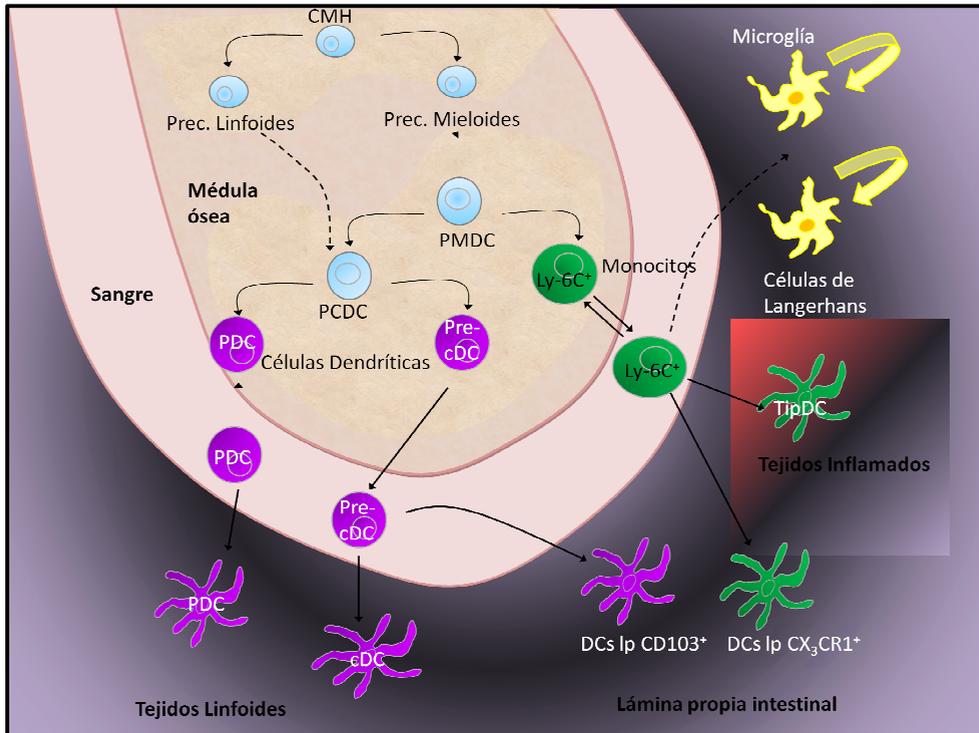


Figura II.- Diferenciación de las células dendríticas en ratón. En la médula ósea, las células madre hematopoyéticas (CMH) originan precursores mieloides y precursores linfoides. Los precursores mieloides dan lugar a su vez a los precursores de monocitos, macrófagos y células dendríticas (PMDC). Estos PMDC originan monocitos, algunas poblaciones de macrófagos y los precursores comunes de célula dendrítica (PCDC). Los PCDC dan lugar a los precursores de células dendríticas convencionales (pre-cDC) y a las células dendríticas plasmacitoides (PDC). Los pre-cDC circulan en la sangre y entran en el tejido linfoides, donde originan las cDC CD8 α ⁺ y las cDC CD8 α ⁻, y en los tejidos no linfoides, donde originan las células dendríticas de lámina propia intestinal CD103⁺ (DCs Ip CD103⁺). En condiciones homeostáticas, los monocitos Ly-6C⁺ dan lugar a las células dendríticas de lámina propia CX₃CR1⁺ (DCs Ip CX₃CR1⁺) en tejidos no linfoides. Durante la inflamación, los monocitos Ly-6C⁺ originan las TipDC. También se cree que contribuyen a la formación de las LC y la microglía (flecha discontinua), en condiciones experimentales. Ambos tipos celulares pueden renovarse independientemente desde la médula ósea (flecha curva). Todavía no está claro si los precursores linfoides contribuyen sustancialmente a las PDC y las cDC (flecha discontinua). Modificado de (Geissmann et al., 2010b).

En condiciones homeostáticas, las pre-cDC se encuentran en la médula ósea, sangre y bazo (Liu et al., 2009; Naik et al., 2006), penetran en los ganglios linfáticos desde la sangre a través de las HEV, constituyendo así el grupo de células dendríticas, donde van a adquirir el fenotipo y morfología de células dendríticas convencionales maduras. El desarrollo de las células dendríticas convencionales también incluye la división celular en los órganos linfoides. Las pre-cDC también pueden diferenciarse en células dendríticas de mucosa CD103⁺ en la lámina propia (Bogunovic et al., 2009; Varol et al., 2009). En cuanto a las células dendríticas procedentes de monocitos, éstos pueden abandonar la sangre y penetrar en los tejidos en condiciones inflamatorias, dando lugar a diferentes subtipos de macrófagos y TipDC, que comparten varias de las características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas, como su capacidad para procesar y presentar antígenos a los linfocitos T (Auffray et al., 2009a; Auffray et al., 2009b; Geissmann et al., 2003a; Serbina et al., 2008; Varol et al., 2009). Por el contrario, ha quedado bien establecido que los monocitos no originan células dendríticas convencionales ni células dendríticas plasmacitoides (Fogg et al., 2006; Liu et al., 2009).

Aunque muchos de los subtipos de células dendríticas se regeneran a partir de progenitores de médula ósea, existen dos excepciones a destacar, las LC y las células de la microglía. Las LC se desarrollan a partir de precursores que colonizan la epidermis antes del nacimiento, se diferencian *in situ* y posteriormente proliferan durante la primera semana de vida para constituir el conjunto de LC. Las LC adultas se auto-renuevan y pueden proliferar masivamente durante la inflamación (Chorro et al., 2009). Así, las LC epidérmicas parece que constituyen sus propios progenitores, mientras que, por contra, las células madre hematopoyéticas y los precursores recirculan entre la periferia y la médula ósea en

los adultos (Wright et al., 2001), pudiendo contribuir directamente a la diferenciación de ciertas células mieloides en los tejidos inflamados (Massberg et al., 2007). Por otro lado, los progenitores de linaje linfoide parecen contribuir muy poco a la conformación de las células dendríticas de tejidos u órganos linfoides periféricos, con la posible excepción del timo. El desarrollo de los linfocitos T y de una proporción de macrófagos tímicos, células dendríticas, células dendríticas plasmacitoides y linfocitos B podría derivarse directamente a partir de progenitores de timocitos del torrente sanguíneo (Li et al., 2009; Wu and Shortman, 2005).

Recientemente se ha revelado la existencia de dos subpoblaciones presentes en la lámina propia intestinal fenotípicamente definibles como CD11c⁺CD103⁺ y CX₃CR1⁺ (Bogunovic et al., 2009; Jaensson et al., 2008; Varol et al., 2009), que derivan de pre-cDC y monocitos Ly6C⁺, respectivamente (Varol et al., 2009). Las células dendríticas CD103⁺ son las únicas con capacidad de migrar desde la lámina propia hacia los ganglios linfáticos mesentéricos (Bogunovic et al., 2009; Schulz et al., 2009), y las células CX₃CR1⁺ tienen poca capacidad para estimular los linfocitos T (Schulz et al., 2009), pudiendo representar macrófagos de la lámina propia más que un tipo de células dendríticas.

2.3. Citoquinas implicadas en el desarrollo de las células dendríticas

Para el completo proceso de desarrollo de la célula dendrítica son necesarias muchas señales dirigidas por citoquinas. La mayoría de estas citoquinas están involucradas en la diferenciación de otras líneas hematopoyéticas, mientras que algunas presentan una gran especificidad en la generación de células

dendríticas o subtipos particulares de éstas. El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) conduce a la generación *in vitro* de células dendríticas mieloides derivadas de progenitores de ratón, a partir de médula ósea de ratón (Caux et al., 1992; Inaba et al., 1992) y humano, a partir de células de sangre periférica (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). GM-CSF es producido por células endoteliales, fibroblastos, linfocitos T y macrófagos. Aunque prácticamente no se detecta en el suero en condiciones basales, su producción se incrementa durante la inflamación (Cebon et al., 1994; Cheers et al., 1988). Así, aunque GM-CSF no es indispensable para el desarrollo de células dendríticas en condiciones basales, sí juega un importante papel en la diferenciación de la célula dendrítica en condiciones inflamatorias.

Por el contrario, la citoquina FLT3L (*FMS-related tyrosine kinase 3 ligand*) es crucial para el desarrollo de las células dendríticas plasmacitoides y células dendríticas convencionales en condiciones basales. Los ratones que carecen de FLT3L presentan niveles bajos de células dendríticas (McKenna et al., 2000), así como los ratones que son deficientes en STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (Laouar et al., 2003), una molécula importante que participa en la cascada de señalización de FLT3L. La administración de FLT3L a ratones o humanos produce niveles elevados de células dendríticas (Maraskovsky et al., 1996; Maraskovsky et al., 2000), efecto que también se observa en cultivos de células de médula ósea con FLT3L, en los que se producen células dendríticas plasmacitoides (Brasel et al., 2000; Naik et al., 2005). De este modo, FLT3L es una citoquina sencilla que conduce la diferenciación de los progenitores de médula ósea hacia todos los subtipos de célula dendrítica *in vitro*, incluyendo la diferenciación de pDC, que no se produce en los cultivos suplementados con GM-CSF. FLT3L se

presenta tanto de forma soluble como unido a la membrana, y es expresado por células del estroma de muchos tejidos y por linfocitos T activados (Lyman and Jacobsen, 1998). Los niveles de FLT3L son medibles en el suero en condiciones basales, y se incrementan en condiciones de inflamación y estrés hematopoyético, así como en la citopenia inducida por irradiación.

M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos, *macrophage colony-stimulating factor*) es una citoquina clave para el desarrollo de los macrófagos. Los ratones que carecen de M-CSF o de su receptor, carecen de importantes poblaciones de macrófagos y desarrollan osteopetrosis por la ausencia de osteoclastos (Dai et al., 2002; Yoshida et al., 1990). Aunque inicialmente se creía que no era necesaria para el desarrollo de células dendríticas, estudios recientes han establecido que esta citoquina es requerida para el desarrollo de LC (Ginhoux et al., 2006). M-CSF incrementa el número de células dendríticas en cultivo, y la inyección de M-CSF aumenta tanto las células dendríticas plasmacitoides como las células dendríticas convencionales de los órganos linfoides en ratones. Esta citoquina es expresada por células del endotelio, del estroma, osteoblastos y macrófagos y, al igual que FLT3L, se detecta en suero en condiciones basales, y su expresión incrementa con la inflamación.

2.4. Ciclo de vida de las Células Dendríticas

Todas las células dendríticas derivan en última instancia de células madre hematopoyéticas y células progenitoras de médula ósea (Figura III). Estas células dan lugar a varios tipos de progenitores que se pueden diferenciar en uno o más subtipos de células dendríticas. Como se observa en la Figura III, estos progenitores parten de la médula ósea, entran en la circulación y se diferencian en célula dendrítica tras cambios sucedidos en los tejidos periféricos, como la piel y

las superficies de las mucosas, los lugares de entrada de patógenos más comunes. De la misma manera, este tipo celular está presente en los órganos linfoides secundarios, donde se inicia la respuesta inmune adaptativa frente a los patógenos. De este modo, las células dendríticas reciben nombres distintos según su localización (LC, células dendríticas intersticiales, células dendríticas dérmicas, células dendríticas tímicas y células dendríticas foliculares).

Una vez posicionadas en los tejidos periféricos, se considera que las células dendríticas están totalmente diferenciadas como células inmunológicamente "inmaduras", un estado en el que se encuentran equipadas con la maquinaria necesaria para la captura de antígenos extraños (Banchereau and Steinman, 1998; Bell et al., 1999), pero sin capacidad para estimular los linfocitos T *naive*. Las células dendríticas inmaduras expresan niveles bajos de moléculas MHC de clase I y II y de moléculas co-estimuladoras y de adhesión, básicas para la interacción con los linfocitos T. Estas células inmaduras responden a las señales de peligro del entorno y pueden interactuar directamente con el estímulo microbiano a través de PRR, como sucede con los receptores TLR (*Toll Like Receptor*), importantes en el reconocimiento de muchos patrones microbianos.

Las células dendríticas inmaduras secretan además quimioquinas pro-inflamatorias, incluyendo la proteína MIP (*Macrophage Inflammatory Protein*) -1 α , también denominada CCL3 (*Chemokine C-C motif ligand 3*), MIP-1 β L (CCL4), proteína MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*) (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-4 (CCL13), RANTES (*Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*; CCL5), TECK (*Thymus-expressed chemokine*; CCL25), SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*; CXCL12, CXC chemokine ligand 12). Además, expresan receptores

de diferentes quimioquinas, como CCR (*C-C Chemokine Receptor*) 2, CCR5, CCR6, CXCR (*C-X Chemokine Receptor*) 1, CXCR2 y CXCR4, capaces de unirse a sustancias producidas por células no inmunes en los sitios de inflamación, y pueda tener lugar la captación de antígenos (Berger and Schultz, 2003; Caux et al., 2000; Chen et al., 2001).

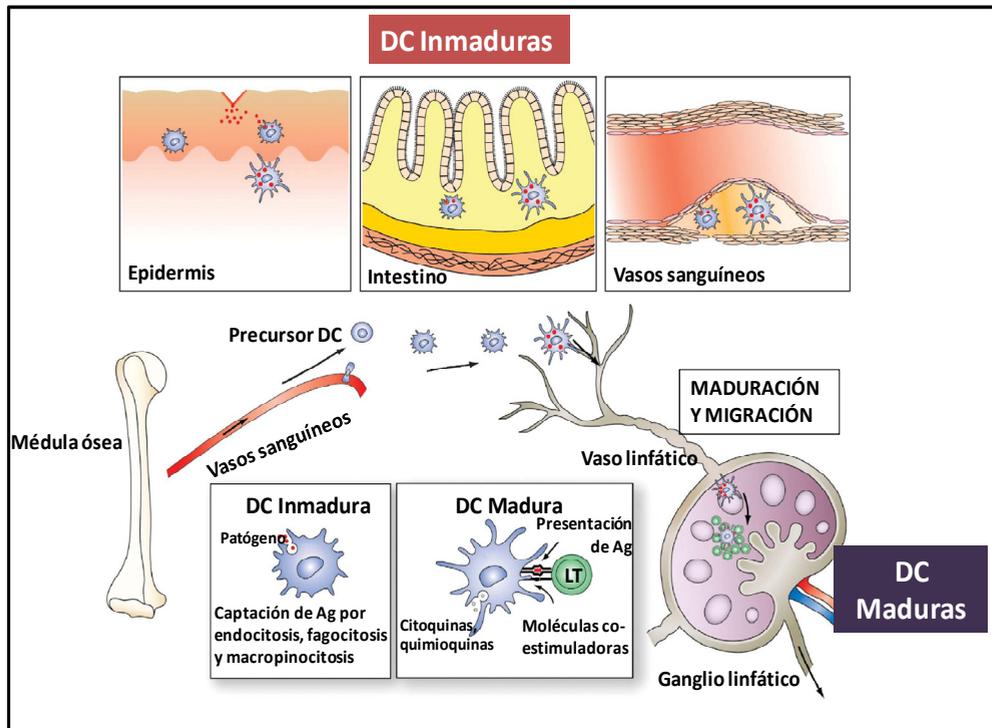


Figura III.- Ciclo de vida de las células dendríticas. Las células dendríticas se diferencian a partir de progenitores de médula ósea, que entran en la circulación y posteriormente llegan a los tejidos periféricos como células dendríticas inmaduras, lugar donde capturan y procesan antígenos presentes en el medio extracelular. Estas células dendríticas inmaduras reciben señales que inducen su maduración y migración hacia los ganglios linfáticos, donde promoverán la activación y polarización de linfocitos T *naive*, orquestándose así la respuesta inmune adaptativa. Adaptado de (Banchereau et al., 2000).

Después de recibir el apropiado estímulo quimiotáctico, las células dendríticas salen del tejido y penetran a través de los vasos linfáticos que drenan en los ganglios linfáticos para dirigirse al área de linfocitos T, donde interactúan con los linfocitos T antígeno-específicos. Las células dendríticas poseen una capacidad única para penetrar en los pequeños vasos linfáticos de los tejidos periféricos, y migrar hacia los ganglios linfáticos locales. Esta migración de la célula dendrítica está acompañada de una menor expresión de los receptores encargados de la captación de antígenos y de su capacidad endocítica, así como de una disminución en la expresión de quimioquinas inflamatorias. Por el contrario, se produce una mayor expresión del receptor de quimioquinas CCR7, que se une a las quimioquinas CCL21/SLC (*Secondary lymphoid organ chemokine*), y a CCL19/MIP-3 β /ELC (*Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine*) (Banchereau and Steinman, 1998).

Tras el viaje al área de linfocitos T de los ganglios linfáticos, las células dendríticas se consideran “*maduras*” (figura III), y se posicionan correctamente para el encuentro con estos linfocitos T (Belz et al., 2004; Henri et al., 2001). Las células dendríticas exhiben un fenotipo inmunoestimulador acorde a una mayor expresión de moléculas MHC clase I y II, y moléculas co-estimuladoras y de adhesión, así como citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas, como TNF- α , IL (interleuquina) -1 β , y citoquinas efectoras, IL-12 (subunidad p40) e IFN- γ (Banchereau et al., 2000; Pulendran, 2005; Steinman, 1991). De esta manera, la habilidad de la célula dendrítica para estimular la expansión clonal de linfocitos T *naive* es dependiente de la migración y del estado de maduración de la célula dendrítica. Una pequeña fracción de células dendríticas puede penetrar en los vasos linfáticos y no quedar retenida en los ganglios linfáticos, sino que viaja a lo

largo de la red linfática hacia la circulación venosa. Estas células dendríticas en sangre pueden descargar la carga antigénica en bazo y tejidos linfoides primarios.

2.5. Características de las células dendríticas

2.5.1. Reconocimiento y procesamiento de antígenos por parte de las células dendríticas inmaduras

Las células dendríticas inmaduras son extraordinariamente eficientes en el reconocimiento y procesamiento de antígenos, a través de la expresión de los receptores PRR intracelulares y de superficie. Concretamente en las células dendríticas destaca la familia de receptores TLR, presentes también en una gran variedad de células del sistema inmune innato, como macrófagos, linfocitos B y neutrófilos. Así, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, que se expresan intracelularmente en los endosomas, son muy importantes para el reconocimiento viral, ya que son activados por ácidos nucleicos virales. TLR7 y TLR8 también pueden ser activados por componentes imidazo-quinolínicos sintéticos (Kumar et al., 2009). Por el contrario, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se expresan en la superficie celular. TLR1, 2, 4 y 6 reconocen lípidos, TLR4 reconoce el LPS de la pared de bacterias gram-negativas, y TLR5 reconoce flagelina.

Tras el reconocimiento y unión de un antígeno proteico extraño a la célula dendrítica inmadura, éste debe ser internalizado y degradado en péptidos antigénicos pequeños, que forman complejos con moléculas de MHC clase I o II. Las células dendríticas emplean diferentes mecanismos para internalizar los antígenos, como la macropinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por receptores Fc, receptores del complemento, receptores de la familia de lectinas

tipo C, receptores “*Scavenger*” y receptores de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) (Banchereau et al., 2000; Fanger et al., 1996).

2.5.2. Relación entre la captación y presentación de antígenos: maduración de las células dendríticas

Para que tenga lugar el inicio de la respuesta inmune, los antígenos son procesados por las células dendríticas gracias a la expresión de PRR. La principal diferencia entre células dendríticas y otras APC es su particular manipulación de los antígenos. Como se comentó en el apartado 2.4. acerca del ciclo de vida de las células dendríticas, tras la captación del antígeno, la célula dendrítica generalmente experimenta un proceso de desarrollo estrictamente regulado, denominado maduración (figura IV). La maduración capacita a estas células para distinguir antígenos propios de extraños, así como para, en caso necesario, orquestar una apropiada respuesta inmune. Tras la detección de productos microbianos o la exposición a citoquinas pro-inflamatorias, las células dendríticas inmaduras se transforman en células dendríticas maduras, células que poseen una capacidad excepcional para la estimulación de los linfocitos T. Esta transición se acompaña de cambios dramáticos en la morfología, movilidad, capacidad endocítica y distribución celular, así como en la expresión de moléculas asociadas a la presentación de antígenos. Tras la sensibilización a la señal de maduración, se observa rápidamente un descenso de la capacidad endocítica de la célula dendrítica. Esta menor regulación de la captación de antígenos se basa en dos mecanismos independientes: el descenso de la expresión en la superficie celular de la mayoría de receptores de antígenos, y la reducción de la macropinocitosis y fagocitosis. Esto desencadena en una posterior restricción en la expresión de antígenos que la célula dendrítica es capaz de presentar tras abandonar los tejidos periféricos.

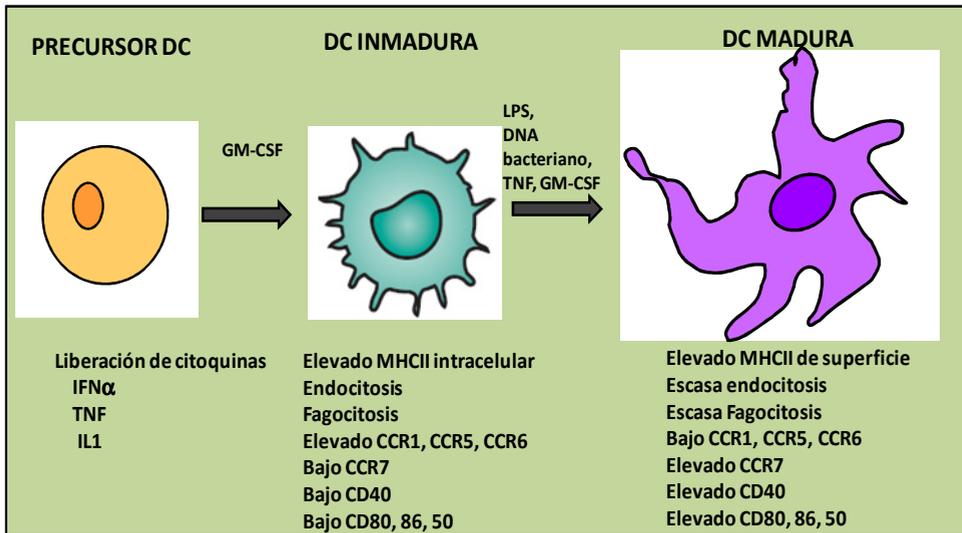


Figura IV.- Maduración de las células dendríticas. En la parte superior del esquema se muestran los factores que pueden inducir la progresión de un estado a otro (GM-CSF, LPS, ADN bacteriano); en la parte inferior se muestran las principales propiedades de cada estado de diferenciación/maduración. Adaptado de (Banchereau et al., 2000).

Uno de los puntos más importantes de la maduración de las células dendríticas es la redistribución de las moléculas de MHC clase II desde los compartimentos intracelulares hacia la superficie celular, así como el aumento de la relación de moléculas co-estimuladoras, CD80 y CD86 (denominadas en conjunto B7), moléculas de adhesión a linfocitos T, CD40 y CD58, y moléculas MHC de clase I. Además, se evidencian cambios morfológicos en la célula dendrítica tras la inducción de la maduración, de forma que las células se expanden en largas proyecciones “dendríticas”, que consisten en realidad en porciones dobladas de la membrana celular que incrementan las posibilidades de interacción con los linfocitos T.

2.5.3. Procesamiento y presentación de antígenos por las células dendríticas maduras

La capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas es una parte esencial de su función, que tiene como finalidad el reconocimiento de un antígeno proteico por parte del linfocito T. En función de la vía que emplee el antígeno para penetrar en la célula, éste será procesado y presentado junto con moléculas de MHC clase I o clase II. El antígeno exógeno (producido fuera de la célula huésped) penetra en la célula dendrítica y es degradado en fragmentos peptídicos dentro de la vía de procesamiento endocítica. Estos antígenos exógenos son capturados por receptores de superficie e internalizados en vesículas denominadas endosomas. Los endosomas contienen enzimas proteolíticas que degradan las proteínas en péptidos. Las moléculas MHC clase II son sintetizadas en el retículo endoplásmico y transportadas en vesículas hacia los endosomas o fagosomas, donde se unen a los péptidos procesados. El complejo MHC clase II/péptido es entonces transportado hacia la superficie, donde puede ser reconocido por los linfocitos T CD4⁺.

En el caso de que se trate de antígenos endógenos, como es el caso de las proteínas virales sintetizadas dentro de la célula huésped infectada con virus y las proteínas únicas sintetizadas por células cancerosas, éstos son degradados en fragmentos peptídicos que se unen a moléculas de MHC clase I dentro del retículo endoplásmico. En este caso, son los linfocitos T CD8⁺ los encargados de reconocer estos antígenos relacionados con moléculas de MHC clase I. La célula dendrítica también es capaz de reciclar el antígeno de regreso a la superficie de forma intacta, donde puede ser presentado a linfocitos B antígeno-específicos. Este

proceso por el que las células dendríticas presentan antígenos de otras células a los linfocitos T se denomina “*cross-presentation*”.

2.6. Células Dendríticas y Tolerancia inmunológica

La tolerancia inmunológica se define como la ausencia de autoinmunidad antígeno específica, y es atribuida a la falta de accesibilidad del antígeno, ausencia de células T (delección) o falta de señales de activación suficientes, durante el proceso de selección clonal en el timo. Además, existen otros mecanismos involucrados en la tolerancia a nivel periférico que incluyen anergia o apoptosis de linfocitos T reactivos, inducción de linfocitos T reguladores y citoquinas inmunoreguladoras secretadas por éstos (Steinman et al., 2003).

Las células dendríticas están consideradas como centinelas del sistema inmune, no sólo debido a su posición central en el inicio de la respuesta inmune primaria, sino también por su implicación en la inducción de tolerancia. La manera en que los linfocitos T y B desarrollan sus receptores antigénicos por recombinación genómica permite la posibilidad de billones de combinaciones diferentes. Muchos de estos receptores de antígenos son potencialmente auto-antigénicos, y reconocen antígenos propios. Para evitar reacciones autoinmunes, estos linfocitos T deben ser delecionados. Los timocitos (precursores de linfocitos T) auto-reactivos son generalmente delecionados por selección negativa en el timo (Palmer, 2003). Tanto las células dendríticas tímicas como las periféricas que han migrado desde los tejidos periféricos son mediadores eficientes de la selección negativa en el timo (Bonasio et al., 2006; Merckenschlager et al., 1999; Proietto et al., 2008).

Algunos linfocitos T auto-reactivos, principalmente los que poseen baja afinidad, logran escapar de la deleción clonal y tienen que ser controlados por la tolerancia periférica para prevenir el daño tisular (Bouneaud et al., 2000; Steinman et al., 2003). Los mecanismos de tolerancia periférica incluyen anergia clonal, deleción clonal y supresión clonal. La anergia tiene lugar cuando las APC presentan auto-antígenos a los linfocitos T *naive* en ausencia de moléculas co-estimuladoras. Éstos generan alteraciones que inhiben la reacción de los linfocitos T contra este antígeno si es reestimulado. La activación de un linfocito T auto-reactivo por estimulación repetitiva o en ausencia de inflamación también puede liderar la activación de receptores de muerte o apoptosis (deleción clonal). Otro mecanismo que induce tolerancia es la supresión clonal, inhibición de los linfocitos T auto-reactivos a través de linfocitos T reguladores. El fallo de estos mecanismos causa el desarrollo de autoinmunidad.

La tolerancia periférica está mediada por células dendríticas inmaduras o semi-maduras (Nouri-Shirazi and Guinet, 2002), en las que probablemente la falta de moléculas co-estimuladoras cumpliría un papel relevante, mientras que la activación de los linfocitos T se produciría por células dendríticas estimuladas (totalmente maduras) (Fazekas de St Groth, 2001). En ausencia de señales inflamatorias o estímulos infecciosos, muchas células dendríticas se mantienen en estado inmaduro, con capacidad de endocitar, procesar y presentar antígenos en forma de complejos péptido-MHC clase I o II, pero incapaces de iniciar la diferenciación de linfocitos T efectores y de memoria. Estas células dendríticas son responsables de diferentes formas de tolerancia periférica, como deleción, anergia, o la expansión de linfocitos T reguladores (Fujii et al., 2004). De hecho, ciertas subpoblaciones de células dendríticas, tales como células dendríticas derivadas de hígado o células dendríticas moduladas con IL-10 (Steinbrink et al.,

1997), serían capaces de disminuir la respuesta inmune. Todas estas células dendríticas presentarían un fenotipo inmaduro (Chieppa et al., 2003; Jonuleit et al., 2001).

2.7. Migración de las células dendríticas

Dado el complejo ciclo de vida que presentan las células dendríticas, la capacidad de estas células y de sus progenitores para migrar a través del cuerpo es un aspecto crítico de su función inmunológica. El término migración engloba varios eventos discretos que ocurren en diferentes microambientes bajo condiciones biofísicas diferentes, e involucra numerosos mecanismos celulares y moleculares. Específicamente, la migración de la célula dendrítica implica: (A) capacidad para abandonar el lugar de nacimiento por parte de las células dendríticas recién formadas o de sus progenitores e ingresar en sangre. (B) Reclutamiento de las células circulantes hacia el interior de los tejidos diana. (C) Alojamiento extravascular y movilidad intersticial necesaria para captar antígenos. (D) Capacidad para acceder a los vasos linfáticos y viajar a través de ellos hacia los ganglios linfáticos, o bien de regreso a la sangre. (E) Capacidad para interactuar con los linfocitos migratorios y otras células inmunes, permitiendo el intercambio de información crítica con respecto a la naturaleza y el contenido de los antígenos presentados.

2.7.1. Moléculas implicadas en la migración de las células dendríticas: QUIMIOQUINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas representan una familia de citoquinas de bajo peso molecular, que se unen a sus receptores desencadenando una serie de vías de señalización intracelular relacionadas con el movimiento y la activación celular. Hasta el momento se han descrito cuatro familias de quimioquinas, C, CC, CXC y

CX3C, que actúan como mediadores de la migración celular tanto en la inmunidad basal (constitutivas) como en condiciones de inflamación (inducibles) (Mantovani et al., 1998; Oppenheim et al., 1991).

Las células migratorias emplean mecanismos muy conservados para percibir y responder a pequeños cambios en la concentración de sustancias quimioatrayentes presentes en el medio externo. Con el paso de los años, se han ido identificando los mecanismos intracelulares y las moléculas de señalización de los receptores de quimioquinas en las células dendríticas, proponiéndose diferentes modelos de transducción de la señal. Todavía no se ha elaborado un modelo global que unifique la diversidad de los receptores de quimioquinas, sus complejas cascadas de señalización y la heterogeneidad de sus efectos biológicos. La mayoría de las investigaciones sobre la señalización que se produce durante la migración de la célula dendrítica se han llevado a cabo en células dendríticas derivadas de monocitos o médula ósea. Estas células dendríticas difieren sustancialmente de algunos subtipos, pero suponen una importante herramienta para el desarrollo de modelos genéricos de las señales que gobiernan la movilización y migración de estas células. En la siguiente tabla (Tabla I), se describe el perfil de migración de los distintos subtipos de células dendríticas de ratón, detallándose la distribución anatómica, así como los receptores de quimioquinas y ligandos implicados en el tráfico de estas células.

Tabla I.- Perfiles de las moléculas implicadas en el tráfico de células dendríticas

Subtipo de Célula Dendrítica	Receptor de quimioquina (ligando)	Ruta de migración
<u>Precursores de Células Dendríticas</u>		
Células madre hematopoyéticas y progenitores	CXCR4 (CXCL12)	
Precursores de Macrófago/ Célula Dendrítica	CX ₃ CR1 (fractalkina)	
Subtipos de monocitos	CX ₃ CR1 (fractalkina), CXCR4 (CXCL12), CCR2(MCP), CCR8 (CCL1), CCR5 (RANTES)	

Las referencias de esta tabla son las siguientes: (Bonasio and von Andrian, 2006; Bursch et al., 2007; Cavanagh et al., 2005; Cella et al., 1999; Diacovo et al., 2005; Fogg et al., 2006; Geissmann et al., 2003a; Ginhoux et al., 2007; Hammad and Lambrecht, 2007; Jung et al., 2000; Ley et al., 2007; Massberg et al., 2007; Naik et al., 2007; Onai et al., 2007; Penna et al., 2001; Poulin et al., 2007; Stutte et al., 2008; Vermi et al., 2005; Vremec et al., 2000; Wright et al., 2002; Zabel et al., 2005).
 Tabla adaptada de (Alvarez et al., 2008).

Tabla I (continuación).- Perfiles de las moléculas implicadas en el tráfico de células dendríticas

Subtipo de Células Dendríticas	Receptor de quimioquina (ligando)	Ruta de migración
<u>Células Dendríticas Diferenciadas</u>		
Células de Langerhans	<u>Inmaduras</u> CCR2 (MCP), CCR6 (CCL20), CX3CR1 (fractalkina)	Epidermis → Dermis
	<u>Maduras</u> CCR7 (CCL19/21), CXCR4 (CXCL12)	Vasos linfáticos aferentes → Ganglio Linfático
Células Dendríticas Dérmicas	<u>Inmaduras</u> CCR2 (MCPs)	Dermis → Vasos linfáticos aferentes
	<u>Maduras</u> CCR7 (CCL19/21), CXCR4 (CXCL12)	Ganglio Linfático
Células Dendríticas CD8α ⁺ , CD8α ⁻	<u>Inmaduras</u> CX ₃ CR1 (fractalkina)	Sangre → Médula Ósea / Órganos linfoides secundarios
	<u>Maduras</u> CCR7 (CCL19/21)	Timo
Células Dendríticas CD8α ⁻ CD4 ⁺	<u>Inmaduras</u> CX ₃ CR1 (fractalkina)	Sangre
	<u>Maduras</u> CCR7 (CCL19/21), CXCR5 (CXCL13)	Bazo

Tabla I (continuación).- Perfiles de las moléculas implicadas en el tráfico de células dendríticas

Subtipo de Células Dendríticas	Receptor de quimioquina (ligando)	Ruta de migración
<u>Células Dendríticas Diferenciadas</u>		
Células Dendríticas Plasmacitoides	<u>Inmaduras</u> CCR2 (MCP), CCR5 (RANTES), CCR9 (CCL25), CXCR3 (CCL9/10/11), CXCR4 (CXCL12) <u>Maduras</u> CCR7 (CCL19/21)	Sangre <pre> graph TD Sangre --> Timo Sangre --> Tejido Sangre --> Medula[Medula Ósea] Sangre --> Organos[Órganos linfoides secundarios] </pre>
Células Dendríticas Pulmón	<u>Inmaduras</u> CCR7 ^{bajo} (CCL19/21) <u>Maduras</u> CCR7 ^{alto} (CCL19/21), CCR8 (CCL1)	Pulmón ↓ Vasos linfáticos aferentes ↓ Ganglio Linfático
Células Dendríticas Lámina propia	<u>Inmaduras</u> CCR6 (CCL20), CX ₃ CR1 (fractalkina) <u>Maduras</u> CCR7 (CCL19/21), CCR8 (CCL1)	Lámina propia ↓ Vasos linfáticos aferentes ↓ Ganglio Linfático
Células Dendríticas Placas de Peyer	<u>Inmaduras</u> CCR6 (CCL20), CCR1 (CCL9), CX ₃ CR1 (fractalkina) <u>Maduras</u> CCR7 (CCL19/21)	Placas de Peyer

2.7.2. Tráfico de la célula dendrítica hacia los ganglios linfáticos:

MIGRACIÓN MEDIADA POR CCR7

El receptor CCR7 pertenece a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembranales (R7DTM) acoplados a proteínas G. Su activación por sus únicos ligandos conocidos (CCL19 y CCL21) se considera el evento dominante en la movilización de la célula dendrítica hacia los compartimentos de linfocitos T en los órganos linfoides (Forster et al., 1999; Sallusto et al., 1999). Aunque el mecanismo mejor conocido implicado en la regulación de la migración de la célula dendrítica hacia los ganglios linfáticos implica a CCR7 y sus ligandos CCL19 y CCL21, aún se desconoce dónde y cómo se produce la regulación de este proceso.

En ratones, se expresan dos genes que codifican dos variantes funcionales de CCL21, la proteína CCL21-Leu, que se expresa en los vasos linfáticos de órganos no linfoides, como pulmones, colon, estómago, corazón y piel, y CCL21-Ser, que se expresa en órganos linfoides, como timo, ganglios linfáticos y bazo. Por el contrario, el genoma humano aparentemente sólo presenta el gen que codifica CCL21-Leu, pero no el que codifica CCL21-Ser (Vassileva et al., 1999). En órganos linfoides secundarios de ratón y humano, CCL21 es producido por células reticulares fibroblásticas del área rica en linfocitos T, y en ratones también en las HEV (Carlsen et al., 2005). Por el contrario, tanto en humanos como en ratones, la expresión funcional de CCL19, el otro ligando funcional de CCR7, está restringida a células reticulares fibroblásticas de los ganglios linfáticos (Link et al., 2007). En la mutación espontánea que sucede en los ratones conocidos como *plt/plt*, están ausentes los genes que codifican CCL19 y la variante CCL21Ser, mientras que el gen que codifica CCL21Leu se conserva intacto (Luther et al., 2000; Nakano and

Gunn, 2001; Vassileva et al., 1999). Se ha demostrado que la pérdida de estas quimioquinas resulta en defectos en la arquitectura y función del timo, así como en la migración defectuosa hacia los órganos linfoides de los linfocitos T y células dendríticas que expresan CCR7 (Luther et al., 2000).

La generación de ratones deficientes en CCR7 (Forster et al., 1999) permitió analizar la implicación de este receptor en la migración y otros aspectos importantes de la biología de las células dendríticas. La principal alteración que se observa en el fenotipo de los ratones que no expresan CCR7 es la desorganización de la microarquitectura de los órganos linfoides. Mientras que CCR7 no está implicado en el reclutamiento de los progenitores de células dendríticas en piel y superficie de mucosas, las células dendríticas procedentes de ratones CCR7^{-/-} presentan defectos para migrar hacia los ganglios linfáticos desde diferentes localizaciones periféricas (Hintzen et al., 2006; Jang et al., 2006; Johansson-Lindbom et al., 2005; Martín-Fontecha et al., 2003; Ohl et al., 2004; Worbs et al., 2006). Estos ratones deficientes en CCR7 también presentan defectos en la activación y posicionamiento de los linfocitos T *naive*, de memoria y reguladores en los ganglios linfáticos, ocasionando alteraciones en las interacciones de estos subtipos de linfocitos T con las diferentes células hematopoyéticas y no hematopoyéticas y, por ello, impidiendo el normal desarrollo y función de los linfocitos T.

Como consecuencia, en los ratones CCR7^{-/-} se observa, por un lado, retraso en la inducción de la respuesta inmune adaptativa y, por otro lado, defectos en la tolerancia central y periférica, así como defectos en la función de los linfocitos T reguladores (Davalos-Misslitz et al., 2007b; Hintzen et al., 2006; Li et al., 2009; Scandella et al., 2007; Schneider et al., 2007; Worbs et al., 2006). Esta

tolerancia inefectiva frente a antígenos propios resulta en fenómenos de autoinmunidad multi-orgánica (Davalos-Misslitz et al., 2007a; Kurobe et al., 2006).

2.7.3. Vías de señalización reguladas por CCR7: modelo “multimodular”

En las células dendríticas, la unión de los ligandos CCL19 y CCL21 al receptor CCR7 desencadena una cascada de señales de transducción que inicia y orquesta un amplio repertorio de eventos moleculares implicados en la regulación diferencial de la respuesta migratoria, que incluyen la velocidad quimiotáctica y otras funciones biológicas adicionales (Figura V). Al igual que otros R7DTM, CCR7 emplea mecanismos dependientes e independientes de la proteína G para transmitir determinadas señales intracelulares (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

Las funciones de supervivencia, velocidad migratoria y quimiotaxis se regulan mediante tres módulos de señalización independientes (Riol-Blanco et al., 2005; Sanchez-Sanchez et al., 2004) (Figura V). La quimiotaxis está controlada por proteínas G sensibles a la toxina de pertussis y también por tres miembros de la familia de MAP quinasas (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) p38, ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), y JNK (*c-jun n-terminal kinases*) (Iijima et al., 2005; Riol-Blanco et al., 2005; Shin et al., 2006). Además de estar implicadas en el fenómeno migratorio, las proteínas MAPK juegan un papel importante en otras muchas funciones de la célula dendrítica, incluyendo la maduración, la proliferación celular, la producción de citoquinas y la supervivencia (Galgani et al., 2004; Khader et al., 2006; Kitanaka et al., 2006; Luft et al., 2004; Nagayama et al., 2000; Sato et al., 2001; Scandella et al., 2004).

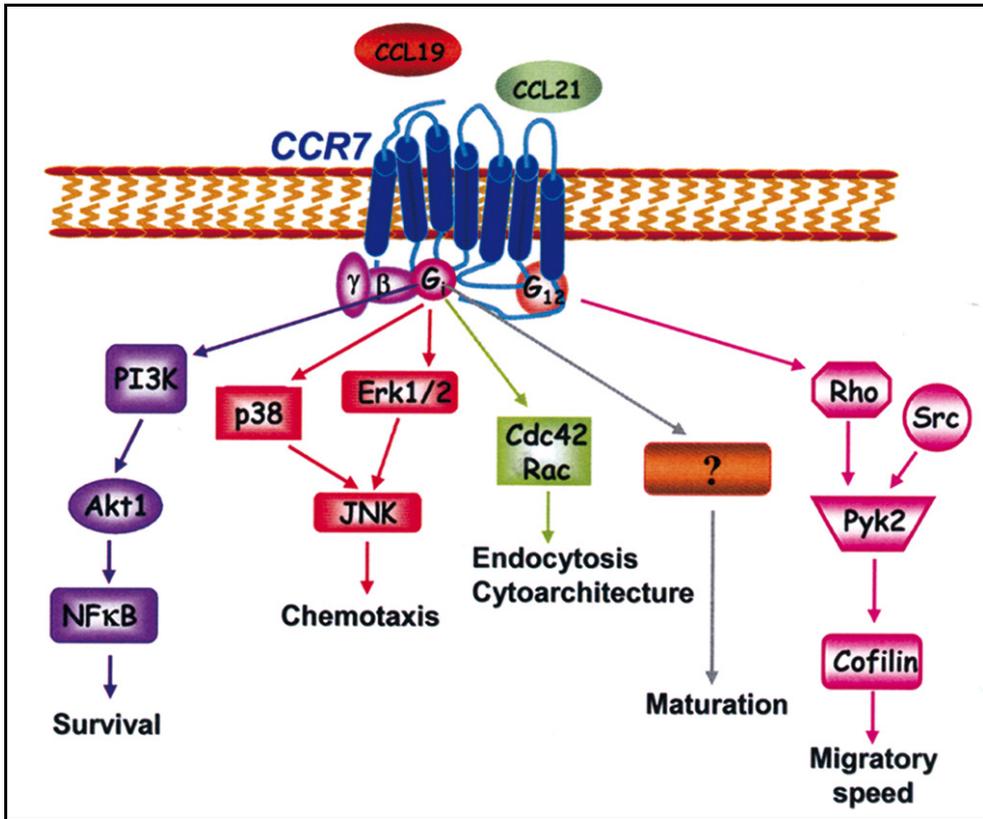


Figura V.- Modelo multimodular de regulación de CCR7. CCR7 podría emplear diferentes módulos para regular diversas funciones en las células dendríticas. Adaptado de (Sanchez-Sanchez et al., 2006).

La unión ligando-CCR7 regula otras funciones en las células dendríticas que incluyen la supervivencia celular mediada por la quinasa de PI3 (*Phosphoinositide 3-kinases*, PI3K) y el factor de transcripción NF-κB (*nuclear factor kappa in B-cells*) (Iijima et al., 2005; Riol-Blanco et al., 2005). Además, la estimulación de CCR7 con los ligandos CCL19 y CCL21 induce el desarrollo de protrusiones dendríticas (Yanagawa and Onoe, 2002), regula positivamente el ratio de endocitosis de las células dendríticas maduras (Yanagawa and Onoe, 2003), aumenta la velocidad de migración, e induce el fenotipo maduro de las células dendríticas, que incluye la

secreción de citoquinas inflamatorias y un aumento de los niveles de MHC y moléculas co-estimuladoras, potenciando la capacidad de las células dendríticas para activar a los linfocitos T *naive* (Marsland et al., 2005).

2.7.4. Otras vías de señalización implicadas en la migración de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos

Aunque la expresión y activación de CCR7 es necesaria para la migración de las células dendríticas residentes hacia los ganglios linfáticos, esta condición no es única ni suficiente, pues CCR7 requiere señales adicionales para responder a sus ligandos. Por ello, existen una serie de factores quimiotácticos que no son quimioquinas, y factores de maduración que pueden ser rápidamente producidos dentro del tejido inflamado o dañado, que juegan un papel importante en el reclutamiento de las células dendríticas y la preparación de éstas para su posterior movilización hacia los ganglios linfáticos (Muller et al., 2003; Schaerli and Moser, 2005; Weninger and von Andrian, 2003).

En este contexto, las células dendríticas inmaduras expresan varios receptores quimiotácticos para agonistas que no son quimioquinas (Kim, 2005; Sozzani, 2005), y esta expresión se ve incrementada por señales de maduración endógenas, como IL-1, TNF- α y CD40L, o por señales exógenas, como productos microbianos que activan los TLR (Crow, 2006; Hemmi and Akira, 2005; Steinman and Hemmi, 2006). La mayoría de estos estímulos desencadenan mecanismos que activan NF- κ B e inducen la expresión de genes pro-inflamatorios (Lindner et al., 2007; Ouaz et al., 2002). Las señales inflamatorias y relacionadas con el estrés celular desencadenan una serie de rutas de señalización que pueden afectar directamente a la migración de la célula dendrítica. Por ejemplo, la activación del receptor de superficie TREM-2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells*) en

células dendríticas derivadas de monocitos humanos, induce una mayor expresión de CCR7, a pesar de una baja expresión de moléculas co-estimuladoras y otros marcadores de maduración de células dendríticas (Bouchon et al., 2001). Los ratones deficientes en DAP-12, un adaptador de la señal de TREM-2, muestran acumulación de células dendríticas en la piel e intestino (Tomasello et al., 2000). En este sentido, son necesarios más estudios que profundicen en el mecanismo por el que TREM/DAP12 podría converger con otras señales intracelulares para actuar sobre CCR7.

Las señales encontradas en los sitios de inflamación, incluyendo mediadores lipídicos, como leucotrienos o la prostaglandina E2 (Robbiani et al., 2000; Scandella et al., 2002), y NAD⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide*) (Partida-Sanchez et al., 2004), que sirve de sustrato para la ectoenzima ADP-ribosil ciclasa CD38, también son necesarias para sensibilizar la respuesta mediada por CCR7 a sus ligandos CCL19 y CCL21.

Todavía no se conoce en detalle cómo actúan estas diferentes señales extracelulares para promover la migración vía CCR7. Se sabe que la quimiotaxis de la célula dendrítica activada por sustancias quimioatrayentes se controla, al menos en parte, por los metabolitos movilizantes de calcio cADPR (*cyclic adenosine diphosphate ribose*) y ADPR (*adenosine diphosphate ribose*) (Lund, 2006; Partida-Sanchez et al., 2007b), dos productos que resultan de la conversión de NAD⁺ por CD38. Los neutrófilos, monocitos y células dendríticas deficientes en CD38 muestran defectos en la respuesta del calcio y la quimiotaxis en respuesta a una variedad de quimioquinas *in vitro* e *in vivo* (Partida-Sanchez et al., 2004; Partida-Sanchez et al., 2003). Los metabolitos derivados de CD38 tienen una gran influencia en la señalización mediada por receptores de quimioquinas en las

células mieloides, presumiblemente por el flujo de calcio a través del canal de membrana plasmática activado por cADPR y ADPR TRPM2 (*transient receptor potential cation channel member 2*) (Partida-Sanchez et al., 2007a), miembro de la superfamilia de canales TRP (*transient receptor potential*) (Fliegert et al., 2007; Perraud et al., 2003). TRPM2 es un canal de cationes no selectivo altamente expresado por los leucocitos, incluyendo las células dendríticas (Fonfria et al., 2006; Massullo et al., 2006; Partida-Sanchez et al., 2007a). Otros receptores de la célula dendrítica que inducen la movilización del calcio podrían también colaborar con el calcio generado por CD38 para transmitir señales que promuevan la migración. Las señales inflamatorias y los productos bacterianos que inducen la maduración de la célula dendrítica y la expresión de CCR7 generalmente suelen incrementar la expresión de CD38 (Farina et al., 2004; Guerrero-Plata et al., 2006; Iqbal and Zaidi, 2007; Partida-Sanchez et al., 2004).

Se sabe que algunos patógenos emplean mecanismos para impedir la migración de la célula dendrítica con el fin de protegerse a sí mismos de la generación de potentes respuestas inmunes adaptativas. Parásitos esquistosomales producen la prostaglandina E2 para inhibir la migración de la célula dendrítica hacia los ganglios linfáticos tras su infección experimental a través de la piel (Angeli et al., 2004b), y antígenos microbianos derivados de *Borrelia garinii*, el agente causante de la enfermedad crónica de Lyme, reducen significativamente la expresión de CD38 y CCR7 en las células dendríticas, lo que dificulta su capacidad migratoria (Hartiala et al., 2007). Es por ello que son necesarios más estudios acerca de cómo las señales derivadas de patógenos, incluyendo las señales a través de los TLR, regulan la migración de las células dendríticas.

3. RECEPTORES NUCLEARES

3.1. La superfamilia de los receptores nucleares

Los receptores nucleares son una superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligando que regulan la expresión de genes implicados en diversos procesos como la reproducción, el desarrollo y el metabolismo (Evans, 1988; Glass and Ogawa, 2006; Mangelsdorf and Evans, 1995; Mangelsdorf et al., 1995). Esta superfamilia está compuesta por 48 miembros en humanos, 21 en *Drosophila* y más de 270 en *Caenorhabditis elegans* (Castrillo and Tontonoz, 2004; Robinson-Rechavi and Laudet, 2003).

Los receptores nucleares se pueden clasificar en tres grupos en base a sus ligandos endógenos. El grupo de los denominados “*receptores clásicos de hormonas esteroideas*”, que fue el primero en caracterizarse y que incluye los receptores de estrógenos, andrógenos, progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides; los denominados “*receptores huérfanos*”, que conservan las características del resto de los miembros de la familia, pero carecen de ligandos fisiológicos descritos e, incluso en algunos casos, pueden actuar de forma independiente de ligando; y los denominados “*receptores huérfanos adoptados*”, que inicialmente se describieron como receptores huérfanos, pero posteriormente se han relacionado con ligandos endógenos. Dentro de estos últimos se encuentran los receptores X de farnesoide o FXR (*Farnesoid X Receptors*), los receptores activados por proliferadores peroxisomales o PPAR (*Peroxisome Proliferator-activated Receptors*), los receptores X de retinoico o RXR (*Retinoid x Receptors*) y los receptores X hepáticos o LXR (*Liver x Receptors*). Todos estos receptores actúan formando heterodímeros con los receptores RXR.

La disponibilidad de ligandos supone uno de los factores determinantes y limitantes de la actividad de los receptores nucleares. Las actividades de los receptores de hormonas esteroideas y de los receptores huérfanos adoptados están controladas por pequeñas moléculas lipofílicas. En el caso de los receptores de hormonas tiroideas y esteroideas, los ligandos naturales son las hormonas clásicas producidas por los órganos endocrinos (Evans, 1988). Estas hormonas se liberan a la circulación, y son transportadas hasta sus tejidos diana, donde difunden hacia el interior de las células y se unen a sus receptores. Esta unión de las hormonas a sus receptores es muy específica. Por el contrario, muchos de los receptores huérfanos adoptados están regulados por metabolitos lipídicos producidos en las células y que actúan de forma paracrina o autocrina, desencadenando rápidos cambios transcripcionales en respuesta a alteraciones de la homeostasis lipídica de la propia célula (Chawla et al., 2001). En el caso de los receptores LXR, estos cambios se encuentran regulados por oxisteroles, que se acumulan en las células cuando se produce un aumento del contenido de colesterol. La unión del ligando a los receptores huérfanos adoptados es generalmente menos específica y presenta menos afinidad que la unión de los receptores de esteroides.

3.2. Estructura de los receptores nucleares

La superfamilia de receptores nucleares posee una estructura altamente conservada (figura VI) que, debido a su función como factores de transcripción, está organizada de manera que permite su unión a las regiones promotoras u otras zonas reguladoras concretas de ADN de los genes diana (genes regulados a nivel transcripcional por el receptor), así como su unión a los ligandos.

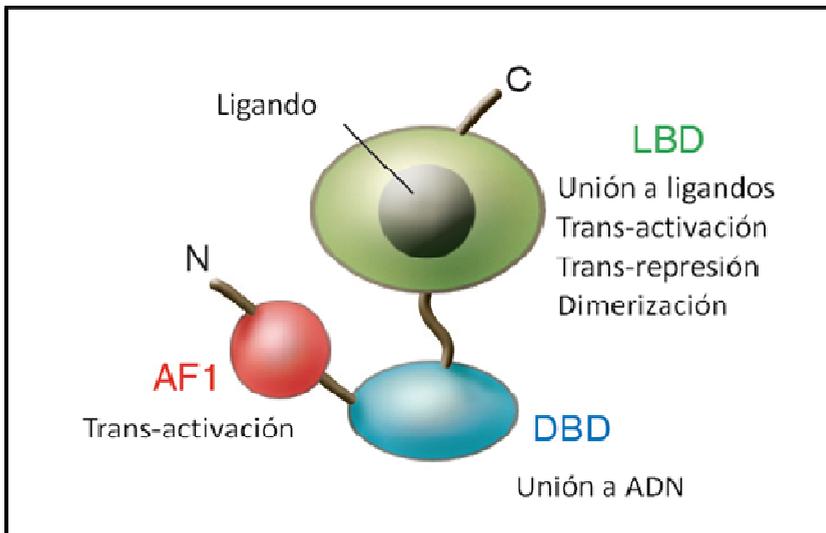


Figura VI.- Estructura de los receptores nucleares. La mayoría de los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares tienen una estructura similar: un dominio amino-terminal, denominado *activation function 1* (AF-1), un dominio central de unión a ADN (DBD) y un dominio carboxi-terminal de unión a ligando (LBD). El LBD determina la especificidad de cada receptor por su ligando, así como las interacciones con co-activadores y co-represores inducidas por ligando, a través de cambios alostéricos en la región α -helicoidal corta conocida como *activation function 2* (AF-2). Adaptado de (Glass, 2006).

La mayoría de los miembros de la superfamilia están compuestos por una región N-terminal que contiene un importante dominio adicional implicado en la activación transcripcional (*activation function 1*, AF-1), poco conservado entre los diferentes receptores nucleares, un dominio central de unión a ADN (*DNA Binding Domain*, DBD) altamente conservado, que media el reconocimiento específico de secuencia de genes diana, y un dominio C-terminal que determina la especificidad de unión a ligando de cada receptor (*Ligand Binding Domain*, LBD) y media las funciones de activación y/o represión transcripcionales mediadas por ligando (*activation function 2*, AF-2).

3.3. Mecanismos de unión de los receptores nucleares a ADN

Los receptores de hormonas esteroideas, como el receptor de estrógenos, son sintetizados como formas inactivas que se asocian con complejos de HSP en el citoplasma (Pratt and Toft, 1997). La unión de la hormona al receptor induce la disociación de estos complejos y la entrada en el núcleo. Una vez allí, estos receptores normalmente se unen como homodímeros a los elementos de respuesta hormonal de sus genes diana (HRE, *hormone response element*) (Glass, 1994). Los HRE constan de dos secuencias palindrómicas, de las que cada una contacta con el DBD de uno de los receptores que forman el homodímero, de manera que cada miembro contacta con el ADN de manera simétrica. Ciertas bases de estas secuencias determinan la especificidad para la unión de los distintos receptores de hormonas esteroideas.

Por el contrario, la mayoría de los receptores huérfanos adoptados, incluyendo PPAR y LXR, se unen a sus genes diana formando heterodímeros con RXR. Los HRE para estos receptores normalmente constan de dos secuencias de reconocimiento dispuestas en el mismo sentido, y se denominan repeticiones directas (DR). La secuencia y el número de bases que separan los dos motivos determinan la especificidad de la unión de distintos heterodímeros y homodímeros (Umesono et al., 1991). Por ejemplo, los heterodímeros PPAR-RXR se unen preferentemente a repeticiones directas separadas por una base (DR-1), mientras que los heterodímeros LXR-RXR se unen a repeticiones separadas por cuatro bases (DR-4) (Glass, 2006; Mangelsdorf and Evans, 1995).

3.4. Mecanismos de activación y represión transcripcional

Los receptores nucleares pueden regular positiva y negativamente la expresión de genes por tres mecanismos principales (figura VII): trans-activación dependiente de ligando, represión activa, y trans-represión dependiente de ligando (Glass, 2006). La unión ligando-receptor a su HRE puede activar la transcripción de genes diana de forma directa (proceso conocido como *trans-activación dependiente de ligando*), que implica el reclutamiento de complejos coactivadores. Los co-activadores interaccionan fundamentalmente con la región AF-2 del LBD (figura VI). La región AF-2 es una hélice α corta, y la unión del ligando la estabiliza creando un sitio de unión de alta afinidad para proteínas co-activadoras que contienen la secuencia consenso LXXLL (Ding et al., 1998; Heery et al., 1997; Shiau et al., 1998; Torchia et al., 1997). Estos complejos funcionan como intermediarios necesarios para el reclutamiento de la enzima ARN polimerasa-II (Glass and Ogawa, 2006; Glass and Rosenfeld, 2000; McKenna and O'Malley, 2002). Los co-activadores tienen la función de transmitir la información proporcionada por los factores de transcripción unidos a las regiones reguladoras de los genes. De este modo, conectan la información que aportan los factores de transcripción con las cascadas de señalización asociadas.

Muchos receptores nucleares, incluyendo PPAR y LXR, se pueden unir a genes diana en ausencia de ligando y, en este estado, reprimen de forma activa la transcripción (fenómeno conocido como *represión activa*) (Glass, 2006). Esta función represora es consecuencia del reclutamiento de complejos co-represores, que actúan como antagonistas de los co-activadores. El número de co-activadores y co-represores (o co-reguladores) de receptores nucleares descritos es muy extenso y existen revisiones exhaustivas sobre ellos (Rosenfeld et al., 2006; Torchia

et al., 1998; Xu et al., 1999). En presencia de ligandos activadores, los co-represores son reemplazados por co-activadores, lo que resulta en la activación de la transcripción. Dentro del grupo de los co-represores, N-CoR (*nuclear-receptor co-repressor*) y SMRT (*silencing mediator of retinoid acid and thyroid-hormone receptors*) son los dos que mejor se conocen (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995). N-CoR y SMRT interaccionan con receptores que no están unidos a ligando a través de motivos hidrofóbicos relacionados con los motivos LXXLL que se encuentran en muchos co-activadores (Hu and Lazar, 1999; Perissi et al., 1999; Webb et al., 2000). En ausencia de ligando, N-CoR y SMRT se encuentran formando complejos con numerosas proteínas, entre las que se incluyen enzimas modificadoras de la cromatina, como las de-acetiladas de histonas (HDAC, *histone de-acetylases*) e histona-metil-transferasas (Guenther et al., 2000; Li et al., 2000; Perissi et al., 1999; Yoon et al., 2003; Zhang et al., 2002).

La *trans-represión dependiente de ligando* consiste en la inhibición de la activación de promotores por parte de otras clases de factores de transcripción de forma dependiente de ligando. El ejemplo mejor conocido son los receptores de glucocorticoides que, tras ser activados por glucocorticoides, son capaces de inhibir la activación de genes de respuesta inflamatoria al interferir con la actividad de los factores de transcripción AP-1 (*activator protein-1*) y NF- κ B (Auphan et al., 1995; Barnes, 1998). Esta actividad trans-represora es promotor-específica, pero no parece que esté implicada la unión del receptor nuclear al ADN. Por ejemplo, el receptor de glucocorticoides parece reprimir promotores diana por sus interacciones con otras proteínas, en lugar de deberse a la unión a HRE. Este mecanismo molecular puede ser el responsable de la acción antiinflamatoria de glucocorticoides como la dexametasona (Reichardt et al., 2001), así como de agonistas de PPAR y LXR (Ogawa et al., 2005; Pascual et al., 2005).

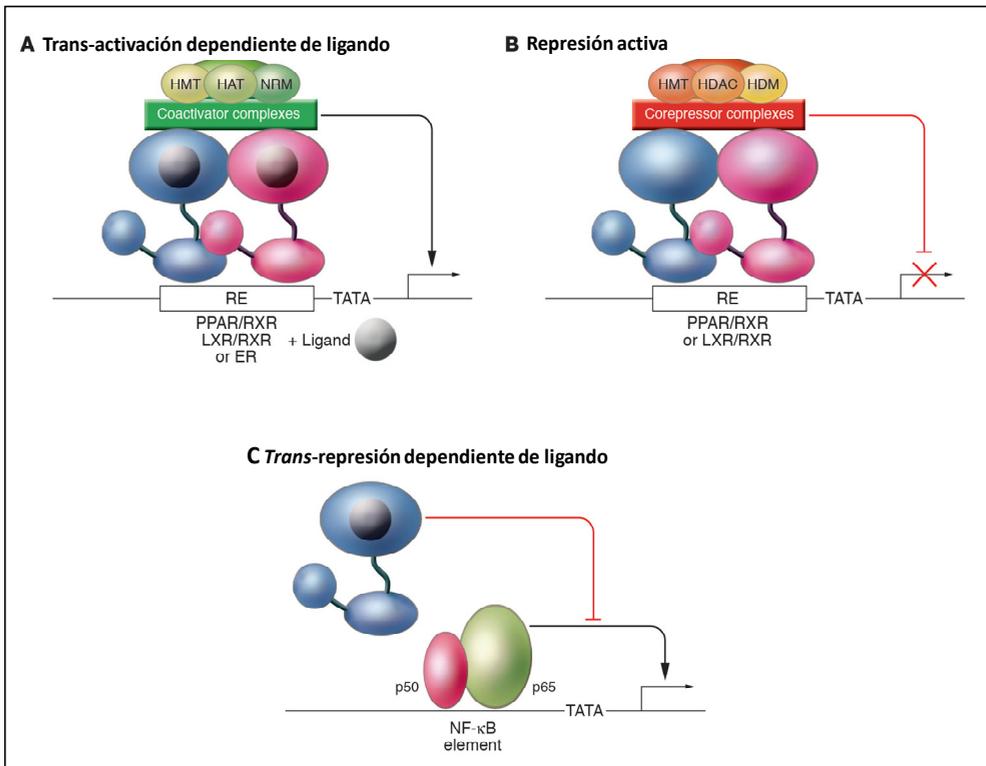


Figura VII.- Mecanismos de unión a ADN de los receptores nucleares. (A) Trans-activación dependiente de ligando. La unión de hormonas o agonistas produce el reclutamiento de complejos co-activadores en el dominio de unión al ligando. (B) Represión activa. Un subtipo de los receptores nucleares heterodiméricos, incluyendo los heterodímeros PPAR/RXR y LXR/RXR, son capaces de unirse a los elementos de respuesta en ausencia de ligando y reclutar complejos co-represores que reprimen activamente la transcripción. (C) Trans-represión dependiente de ligando. Muchos receptores nucleares, incluyendo los receptores de glucocorticoides, de estrógenos, PPAR, y LXR, son capaces de antagonizar la activación de genes de respuesta inflamatoria por factores de transcripción como NF- κ B. Adaptado de (Glass, 2006).

4. RECEPTORES X HEPÁTICOS (LIVER X RECEPTORS, LXR)

4.1. LXR: isoformas, ligandos y distribución

La subfamilia de receptores nucleares LXR pertenece al grupo de los receptores nucleares huérfanos adoptados, y está compuesta por dos miembros, LXR α y LXR β (NR1H3 y NR1H2, respectivamente, en la nomenclatura estándar). Aunque originalmente se clonaron como receptores huérfanos al no conocerse sus ligandos naturales, posteriormente se descubrió que metabolitos modificados del colesterol denominados oxisteroles, como 22-(R)-, 24-(S)-, 27-, y 24-(S),25-epoxicolesterol, se unen a estos receptores e inducen la actividad transcripcional de LXR a concentraciones fisiológicas (Janowski et al., 1996; Lehmann et al., 1997). Estos derivados del colesterol están presentes en los complejos lipídicos que forman las lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*), y se acumulan en los tejidos a concentraciones capaces de activar los receptores *in vivo* (Lehmann et al., 1997). Posteriormente, se desarrollaron potentes ligandos sintéticos capaces de activar estos receptores de manera muy específica y eficaz (Collins et al., 2002), como el compuesto GW3965 (desarrollado por la casa comercial *Glaxo Wellcome*), el compuesto LG268 (desarrollado por la casa comercial *Ligand Pharmaceuticals*), y el compuesto T0901317 (desarrollado por la casa comercial *Tularik*). Los ligandos GW3965 y T0901317 son específicos de los receptores LXR, y el compuesto LG268 actúa como activador de los receptores RXR.

Estos receptores contienen los dominios funcionales comunes a la mayoría de los receptores nucleares (Apfel et al., 1994; Willy et al., 1995) y su actividad depende de la formación de heterodímeros con RXR, de manera que el complejo

puede ser activado por ligandos de ambos componentes. Los heterodímeros LXR/RXR residen en el núcleo asociados a moléculas co-represoras, y unidos a elementos de respuesta a LXR (LXRE, *LXR response element*), que consisten en repeticiones directas de la secuencia “AGGTCA”, separadas por cuatro nucleótidos (DR-4). En ausencia de ligando, se mantiene la interacción de LXR/RXR con los co-represores, reprimiendo la actividad transcripcional de genes diana. La unión de los ligandos a LXR produce un cambio conformacional, que facilita el desplazamiento del complejo co-represor y la asociación de co-activadores, que facilitan la transcripción de genes diana (Glass and Rosenfeld, 2000). La activación por parte de ligandos de LXR también inhibe la transcripción de determinados genes por parte de promotores que no contienen LXRE, a través de un mecanismo de trans-represión.

Los dominios de unión al ligando de las isoformas LXR α y LXR β presentan gran similitud en su secuencia, y parece que son activados por ligandos endógenos similares. Sin embargo, ambas isoformas difieren en su distribución tisular. Mientras que LXR α se expresa mayoritariamente en hígado, y está presente de manera significativa en intestino, tejido adiposo y macrófagos, LXR β se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tejidos analizados hasta el momento (Repa and Mangelsdorf, 2000).

4.2. Principales funciones de LXR

4.2.1. Implicación de LXR en el metabolismo lipídico

Existen muchas evidencias que sostienen la teoría de que los receptores LXR funcionan como sensores de colesterol en el organismo. La identificación inicial de los oxisteroles como ligandos fisiológicos de LXR supuso una primera

aproximación del papel de estos receptores en el metabolismo de colesterol (Janowski et al., 1996; Lehmann et al., 1997). Esta hipótesis fue confirmada tras los resultados obtenidos en estudios realizados en ratones $LXR\alpha^{-/-}$, al observarse una marcada acumulación de ésteres de colesterol en el hígado de estos ratones tras ser sometidos a una dieta rica en colesterol (Peet et al., 1998). Este fenotipo permitió identificar la enzima Cyp7a1 (citocromo P450, familia 7, subfamilia A, polipéptido 1), enzima limitante de la síntesis de ácidos biliares por la vía clásica, como el primer gen diana directo de LXR, resultando la disminución hepática de Cyp7a1 en una drástica reducción de la conversión de colesterol en ácidos biliares, y la subsiguiente acumulación hepática de ésteres de colesterol en el hígado.

El análisis posterior de la expresión de genes en células procedentes de ratones deficientes en los receptores LXR, y estudios *in vitro* usando células tratadas con los ligandos sintéticos de LXR, reveló que estos receptores juegan un papel importante en el control del metabolismo del colesterol y la homeostasis lipídica (Peet et al., 1998; Schultz et al., 2000). Estos estudios han permitido identificar varios genes diana de LXR, implicados en el mecanismo de transporte reverso de colesterol, en el que el exceso de colesterol es transferido en partículas HDL (*high-density lipoproteins*, lipoproteínas de alta densidad), desde las células periféricas hacia el hígado para su excreción en la bilis. De forma más precisa, se han identificado como dianas de LXR a diferentes miembros de la familia de genes que codifican transportadores de membrana ABC (*ATP binding cassette*), relacionándose con la capacidad de los ligandos de LXR para elevar los niveles plasmáticos de HDL e inhibir la absorción intestinal de colesterol (figura VIII).

Un miembro de esta familia particularmente bien caracterizado es ABCA1 (Venkateswaran et al., 2000a). En este trabajo se postuló que la carga de una

célula con esteroides supone un mecanismo que activa los receptores LXR para que, a través de ABCA1, se rebaje esa concentración lipídica. Repa y colaboradores establecieron que los heterodímeros LXR/RXR son reguladores clave de la expresión de ABCA1 *in vivo*, y mostraron que la activación dependiente de ligando de LXR inhibe la absorción intestinal de colesterol (Repa et al., 2000b). También se identificó un elemento de respuesta a LXR en el promotor del gen de ABCA1 (Costet et al., 2000). Schwartz y colaboradores demostraron que la expresión de ARNm de ABCA1 se induce en macrófagos en respuesta a la carga lipídica, y que la expresión y activación de LXR estimula la eliminación de colesterol mediada por ApoA1 (apolipoproteína AI) (Schwartz et al., 2000). La capacidad de los ligandos de LXR para aumentar los niveles de colesterol HDL en ratones coincide con la conocida función de ABCA1 en el transporte reverso de colesterol (Venkateswaran et al., 2000a). Además, los ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ desarrollan esplenomegalia y acumulan células espumosas en múltiples tejidos periféricos, un fenotipo muy similar al de los ratones ABCA1 $^{-/-}$ (Schuster et al., 2002; Tangirala et al., 2002).

También se han identificado como genes diana de LXR otros transportadores ABC, como ABCG1 (Kennedy et al., 2001; Sabol et al., 2005; Venkateswaran et al., 2000b), ABCG5 y ABCG8 (Berge et al., 2002; Repa et al., 2002). De forma similar a ABCA1, la expresión de ABCG1 se induce fuertemente por la carga de colesterol de los macrófagos. En cuanto a ABCG5 y ABCG8, existen estudios que demuestran que la inducción dependiente de LXR de ABCG5 y ABCG8 limita la absorción intestinal de colesterol. Además, la inducción hepática de estos transportadores promueve la excreción de colesterol en la bilis.

Otro gen diana de LXR importante en la homeostasis de colesterol es apoE (apolipoproteína E). Al contrario que ABCA1, la regulación de apoE por LXR es específica de tejido y sólo ocurre en macrófagos y adipocitos (Laffitte et al., 2001). ApoE media el aclaramiento hepático de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very-low-density lipoprotein*) y quilomicrones, y puede actuar como un aceptor extracelular de colesterol en el mecanismo de eliminación mediado por ABCA1 (Curtiss and Boisvert, 2000). Así, LXR induce la expresión de múltiples lipoproteínas que pueden actuar como aceptores de colesterol (figura VIII). LXR regula también positivamente diversas enzimas relacionadas con la remodelación de lipoproteínas, incluyendo la lipoproteína lipasa (LPL), la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP, *cholesterol ester transfer protein*), y la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP, *phospholipid transfer protein*). Es probable que algunas de las acciones de los agonistas de LXR sobre los niveles de HDL y VLDL estén implicadas en el control de estas enzimas remodelantes de lipoproteínas (Repa and Mangelsdorf, 2000; Tontonoz and Mangelsdorf, 2003).

Además de su capacidad para regular el metabolismo del colesterol, los receptores LXR también están implicados en la lipogénesis hepática. El tratamiento de ratones con agonistas sintéticos de LXR eleva los niveles de triglicéridos circulantes y su acumulación en el hígado, un efecto que supone un gran obstáculo para el desarrollo de estos compuestos como fármacos aplicables humanos (Joseph et al., 2002a; Schultz et al., 2000). La actividad lipogénica de LXR se traduce en un aumento de la expresión del principal regulador de la lipogénesis hepática SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein 1c*) (Horton et al., 2002; Repa et al., 2000a), así como la inducción de la sintasa de ácidos grasos (FAS, *fatty acid synthase*) (Joseph et al., 2002a), carboxilasa acil-CoA, y la desaturasa esterol-CoA 1 (Tontonoz and Mangelsdorf, 2003).

Los receptores LXR también intervienen en el control de la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa. Existen trabajos que demuestran que el agonista de LXR T0901317 mejora la sensibilidad a la insulina en ratas resistentes a la hormona insulina (Cao et al., 2003). Laffitte y colaboradores recogieron que el agonista GW3965 mejora la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con una dieta alta en grasa (Laffitte et al., 2003). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren una regulación coordinada de genes implicados en el metabolismo de la glucosa en varios tipos celulares. La activación de LXR en el hígado permite el aumento de expresión de glucoquinasas, y la disminución de la expresión de genes relacionados con la gluconeogénesis hepática. En el tejido adiposo, la activación de LXR permite la inducción transcripcional del transportador de glucosa sensible a la insulina GLUT 4 (*glucose transporter type 4*) (Dalen et al., 2003; Laffitte et al., 2003).

4.2.2. LXR y aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por alteraciones en el metabolismo lipídico, que degeneran en el desarrollo de un estado inflamatorio crónico dentro de la pared arterial. En base a los datos expuestos en el apartado anterior, puede plantearse que la capacidad de los receptores LXR para incrementar el transporte reverso de colesterol mediado por ABCA1 y atenuar la respuesta inflamatoria en los macrófagos podría ser beneficiosa. Los estudios con ganancia o pérdida de función indican que la activación de LXR tiene potentes efectos anti-aterogénicos. Así, el tratamiento de ratones propensos a aterosclerosis Apoe^{-/-} y LDLR^{-/-} con un ligando sintético de LXR disminuyó al 50% el tamaño de la lesión ateromatosa (Joseph et al., 2002b). En este trabajo se observó cómo en muestras de aortas de ratones tratados con el ligando se indujo la expresión de ABCA1 y ABCG1, mientras que la expresión de genes inflamatorios

se vio reprimida, lo que revela la existencia de un mecanismo dual anti-aterogénico beneficioso. Por el contrario, la pérdida de la expresión de los receptores LXR en progenitores hematopoyéticos en macrófagos, realizada mediante el trasplante de médula ósea de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ en ratones $Apoe^{-/-}$ o $LDLR^{-/-}$, se tradujo en un marcado incremento del tamaño de la lesión (Tangirala et al., 2002). El estudio llevado a cabo por Levin y colaboradores ha establecido que el tratamiento de ratones $LDLR^{-/-}$ con un agonista de LXR reduce el tamaño de las lesiones preexistentes, y esta reducción es dependiente de la actividad de LXR en macrófagos (Levin et al., 2005). Estos estudios confirman que LXR supone un importante mecanismo homeostático en el macrófago, que ayuda a proteger contra el exceso de colesterol, y apuntan a que LXR supone un blanco atractivo para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

4.2.3. LXR e inflamación

Como se comentó en el apartado anterior, la aterosclerosis es reconocida como una enfermedad inflamatoria crónica, así como un desorden del metabolismo lipídico. Diversos estudios han explorado el papel de LXR en los mecanismos inflamatorios en el macrófago. Existe una relación recíproca entre el metabolismo lipídico y la expresión de genes inflamatorios en macrófagos activados tratados con ligandos de LXR. Los agonistas de LXR inhiben la expresión de una serie de genes relacionados con la inflamación y la respuesta inmune innata (Castrillo et al., 2003a; Joseph et al., 2003). Por ejemplo, la inducción de los genes inflamatorios *iNOS* (*inducible nitric oxide synthase*), *COX-2* (*cyclooxygenase-2*), *IL-6*, *MCP-1* y *MMP-9* (*matrix metalloproteinase 9*) en respuesta a patógenos bacterianos y a citoquinas pro-inflamatorias es inhibida por la activación de LXR. Además, se observa una represión de la expresión de genes inflamatorios por LXR en macrófagos de ratones de genotipo salvaje (*Wild Type*, *WT*), $LXR\alpha^{-/-}$ y $LXR\beta^{-/-}$,

pero se encuentra abolida en las células $LXR\alpha\beta^{-/-}$ (figura VIII). Estos resultados indican que ambas isoformas de LXR poseen actividad anti-inflamatoria.

La inhibición de la señalización inflamatoria por parte de LXR no se limita a macrófagos aislados, sino que también se ha observado *in vivo*. Se han establecido tres modelos de inflamación en el ratón para explorar la potencial utilidad de los agonistas de LXR como agentes anti-inflamatorios: la respuesta séptica inducida por LPS, la dermatitis alérgica de contacto e irritante, y la inflamación crónica aterogénica. En el primer modelo, la inyección intraperitoneal de LPS, desencadena una respuesta sistémica exacerbada en ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$, que se midió a través de los niveles de citoquinas y la expresión de genes inflamatorios en el hígado (Joseph et al., 2003). En el segundo modelo, se observó que los agonistas de LXR reducen de forma drástica la respuesta inflamatoria en modelos de inflamación cutánea inducida por TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*), y en la dermatitis alérgica inducida por oxazolona (Fowler et al., 2003; Joseph et al., 2003). Finalmente, en el tercer modelo, se apreció que la administración del agonista sintético de LXR redujo la expresión de genes inflamatorios, como MMP-9, en el contexto de la inflamación crónica ateromatosa en ratones hipercolesterolémicos $apoE^{-/-}$ y $Ldlr^{-/-}$ (Joseph et al., 2003; Terasaka et al., 2005). Todas estas observaciones sugieren que los agonistas de LXR podrían ejercer estos efectos anti-aterogénicos no sólo promoviendo la eliminación de colesterol, sino también actuando como limitantes de la producción de mediadores inflamatorios en la pared arterial. Además, esto sugiere que la represión dependiente de LXR de la expresión de genes inflamatorios podría ser útil para controlar el exceso de inflamación que tiene lugar en una gran variedad de enfermedades.

4.2.4. LXR e inmunidad innata

Estudios recientes indican una nueva función de los receptores LXR en la repuesta inmune innata. Los ratones que carecen de los receptores LXR son muy susceptibles al patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* (Joseph et al., 2004). El trasplante de médula ósea de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ en ratones WT supuso un incremento de la carga bacteriana, mientras que el trasplante de medula ósea WT en ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ revirtió completamente la susceptibilidad a la infección por *L. monocytogenes*. Esto sugiere que los ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ presentan una respuesta inmune innata alterada. Además, esta incapacidad de los ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ para generar una respuesta adecuada frente a infección se correlacionó con niveles elevados de apoptosis de macrófagos.

Este incremento de la susceptibilidad de los macrófagos $LXR\alpha\beta^{-/-}$ frente a la apoptosis inducida por patógenos se debe a la pérdida de regulación del gen anti-apoptótico *Aip6* (*apoptosis inhibitor macrophage*, *Aim/Sp α*) por $LXR\alpha$, primer gen diana selectivo de una isoforma de LXR que se ha descrito hasta la fecha. De forma similar, la activación de los heterodímeros LXR/RXR por los ligandos sintéticos y naturales inhibe la apoptosis de los macrófagos en respuesta a un estímulo apoptótico (como cicloheximida) y a la infección con *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, y *Salmonella typhimurium* (Valledor et al., 2004). Esto se atribuye a la inducción de *Sp α* y otros factores anti-apoptóticos, así como a la inhibición de una serie de genes pro-apoptóticos. La regulación selectiva de *Sp α* por $LXR\alpha$ durante la infección sugiere que esta isoforma podría tener funciones únicas en la inmunidad innata.

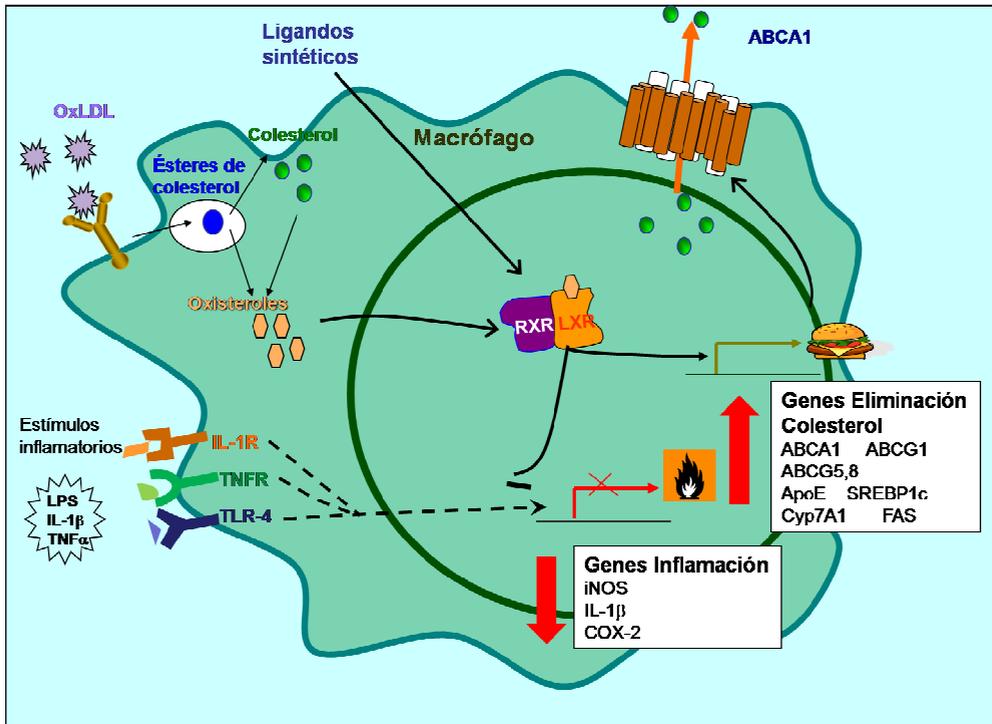


Figura VIII.- Papel de LXR en el mecanismo de eliminación de colesterol y la respuesta inmune innata. Los receptores LXR inducen la expresión de genes relacionados con la eliminación de colesterol en el macrófago. Además, LXR inhibe la expresión de diversos genes inflamatorios inducidos por productos bacterianos y citoquinas pro-inflamatorias, como LPS, IL-1 β , TNF α . Adaptado de (Castrillo and Tontonoz, 2004).

Resultados recientes de nuestro laboratorio, han revelado la importancia de la señalización de LXR en la eliminación de las células apoptóticas por parte de las células fagocíticas, y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria (Alonso-González et al., 2009). La retirada efectiva de las células apoptóticas por los macrófagos es esencial para la homeostasis inmune. Los mecanismos transcripcionales que permiten a los macrófagos percibir y responder a las células apoptóticas están muy poco definidos. Este trabajo demuestra que la retirada de las células apoptóticas activa LXR e induce la expresión de Mer, un receptor de

tirosina quinasa crítico para la fagocitosis (Alonso-González et al., 2009). Los macrófagos deficientes en LXR mostraron un defecto selectivo en la fagocitosis de células apoptóticas y una respuesta pro-inflamatoria anómala. Como consecuencia de estos defectos, los ratones que carecen de los receptores LXR manifestaron un fallo en el desarrollo de la tolerancia inmunológica y desarrollaron auto-anticuerpos y glomerulonefritis autoinmune. Además, el tratamiento de ratones con un agonista de LXR produjo una disminución de la progresión de la enfermedad en un modelo de ratón con problemas de autoinmunidad tipo lupus. Así, la activación de LXR por células apoptóticas promovió su propia retirada y la supresión de los mecanismos inflamatorios.

4.2.5. LXR en la inmunidad adquirida

Además de su importancia en las células del sistema inmune innato, evidencias recientes sugieren la existencia de una relación entre el metabolismo de los esteroides, los receptores LXR y la respuesta inmune adaptativa (Zelcer and Tontonoz, 2006). Como se comentó en el apartado 1.3., una importante característica de la inmunidad adaptativa es la capacidad de los linfocitos antígeno-específicos para desencadenar una rápida y extensa proliferación en respuesta a un cambio antigénico. Se ha descrito que la disponibilidad intracelular de esteroides está regulada dinámicamente durante la activación de los linfocitos, y que es probable que la respuesta transcripcional y el control del ciclo celular en linfocitos T estén mediados por la regulación recíproca de los programas transcripcionales de SREBP y LXR (Bensinger et al., 2008). El análisis de cultivos primarios de linfocitos estableció que la activación de LXR β por ligandos fisiológicos o farmacológicos disminuye la capacidad proliferativa de los linfocitos T, al promover la salida de colesterol y limitar así el contenido de esteroides de las células. De este modo, la pérdida genética de LXR β rescata a las células del efecto

inhibitorio de los agonistas de LXR y potencia la expansión linfocitaria. Los efectos de LXR en la proliferación celular se deben al control del metabolismo celular del colesterol a través del transportador ABCG1 (Bensinger et al., 2008). La capacidad de las rutas metabólicas de colesterol reguladas por LXR para modular la expansión linfocitaria revela un nuevo mecanismo de señalización regulador de la función de los linfocitos T y la respuesta inmune adquirida.

5. PAPEL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Aunque la regulación transcripcional del proceso de diferenciación de las células dendríticas está poco caracterizada, varias evidencias sugieren que diversos factores de transcripción y citoquinas son necesarios para el desarrollo de la célula dendrítica (Zenke and Hieronymus, 2006). Se ha demostrado que ligandos lipofílicos (retinoides, glucocorticoides, vitamina D) de los receptores nucleares, implicados en el proceso de desarrollo y la regulación metabólica también juegan un papel importante en el sistema inmune. Las dianas principales de estos ligandos en el sistema inmune son los linfocitos, aunque descubrimientos recientes sugieren que los activadores de estos receptores pueden también modular la diferenciación y función de la célula dendrítica. Algunos datos indican que, en mayor o menor medida, 20 de los 48 receptores nucleares están presentes en células dendríticas derivadas de monocitos humanos (Torocsik et al., 2010). De entre ellos, varios de los heterodímeros de RXR se expresan de manera muy significativa durante la diferenciación de las células dendríticas. Estudios adicionales de microarrays realizados con células dendríticas humanas demuestran que la expresión de algunos receptores nucleares, como PPAR γ y LXR α , se induce durante el desarrollo (Le Naour et al., 2001).

Aunque están bien descritos los efectos inmunosupresores de glucocorticoides y de vitamina D, cuyas dianas fundamentales son los linfocitos T, observaciones *in vitro* e *in vivo* sugieren que estos ligandos también disminuyen la inmunogenicidad de las células dendríticas. Este efecto genera una clara inhibición o efecto inmunosupresor/tolerogénico en el fenotipo de estas células, lo que les confiere especial importancia para su análisis como posibles dianas terapéuticas (Abe and Thomson, 2003; Hackstein and Thomson, 2004; van Etten and Mathieu, 2005).

En el organismo existen varios compartimentos de tejidos en los que probablemente las células dendríticas estén expuestas a grandes cantidades de lípidos, como ocurre en la lámina propia del intestino delgado, encargada del mantenimiento de la tolerancia periférica (Nagler-Anderson and Shi, 2001), y donde los mediadores lipídicos de la dieta podrían contribuir a esta tolerancia. Además, se ha constatado que la placa aterosclerótica contiene macrófagos y linfocitos T, así como células dendríticas (Angeli et al., 2004a; Bobryshev and Lord, 1995). En este microambiente, las células se encuentran con lipoproteínas oxidadas de baja densidad (oxLDL), ricas en oxisteroles y otros mediadores lipídicos, que pueden influir en la regulación de las propiedades migratorias e inmunológicas de las células dendríticas. De hecho, diversos estudios destacan la capacidad de las células dendríticas para percibir los lípidos presentes en el ambiente mediante la expresión de receptores de membrana. Por ello, las células dendríticas tienen capacidad para inspeccionar la concentración de lípidos en el ambiente gracias a estos receptores nucleares de hormonas.

Los posibles candidatos para percibir estos lípidos en las células dendríticas son los receptores PPAR, que actúan como sensores de ácidos grasos y regulan diferentes facetas del metabolismo lipídico. La mayoría de los estudios en este

área se han realizado en la isoforma PPAR γ , reguladora de funciones importantes en la biología de las células dendríticas. Se ha demostrado que células dendríticas humanas derivadas de monocitos (Gosset et al., 2001; Le Naour et al., 2001), así como en tejido linfóide secundario (Szatmari et al., 2004) presentan una elevada expresión de PPAR γ . En lo referente a las células dendríticas de ratón, se ha demostrado su expresión en células dendríticas esplénicas (Faveeuw et al., 2000), así como en células dendríticas derivadas de médula ósea (Hammad et al., 2004).

Los efectos de la activación de PPAR γ sobre la función inmunológica y el fenotipo de las células dendríticas se han investigado en detalle, y se sabe por tanto que la activación de estos receptores aumenta la capacidad fagocítica y disminuyen la capacidad migratoria de las células dendríticas inmaduras (Angeli et al., 2003; Appel et al., 2005; Szatmari et al., 2004). Además, la activación de PPAR γ altera el patrón de expresión de superficie de moléculas co-estimuladoras, con una expresión menor de CD80 y mayor de CD86 (Zapata-Gonzalez et al., 2008). También se produce una menor secreción de citoquinas, con lo que su capacidad para activar los linfocitos T disminuye (Gosset et al., 2001), y una expresión menor de CCR7 (Nencioni et al., 2002). Este hecho se ha observado tanto en células dendríticas humanas como en células dendríticas de ratón (Klotz et al., 2007). El ácido retinoico y sus derivados (ligandos de los receptores RAR y RXR) ejercen un efecto modulador del sistema inmune, regulando la diferenciación y funcionalidad tanto de linfocitos como de células dendríticas. Actualmente existen resultados contradictorios sobre si el ácido retinoico incrementa o reprime la inmunogenicidad de las células dendríticas. Por un lado, se ha visto que las células dendríticas esplénicas de ratón tras el tratamiento con ácido retinoico se encuentran menos estimuladas (Bedford and Knight, 1989), y, por otro, existen

estudios que afirman que este ligando promueve la actividad de NF- κ B, implicada en la diferenciación y maduración del monocito hacia célula dendrítica (Geissmann et al., 2003b). Además, también se ha observado que el tratamiento de LC con el ácido retinoico induce una mayor capacidad de activación de los linfocitos T (Meunier et al., 1994).

Independientemente de los datos anteriores, el papel de estos receptores en las células dendríticas es poco conocido. Estudios realizados con células dendríticas humanas muestran que la estimulación por ligandos de LXR bloquea la activación de los linfocitos T (Geyerregger et al., 2007). Sin embargo, al no observarse simultáneamente variaciones significativas en la expresión de moléculas co-estimuladoras, relacionadas con la presentación de antígenos, permanecen sin conocerse varias cuestiones relativas a la funcionalidad de estas observaciones. Durante la fase inicial de redacción de este trabajo se ha publicado un estudio analizando la activación de los receptores LXR sobre la diferenciación y funcionalidad de células dendríticas humanas (Torocsik et al., 2010). Los resultados obtenidos *in vitro* muestran un incremento de la expresión de marcadores de maduración como CD80 y CD86 tras la activación de LXR, efecto que viene acompañado de un incremento en la producción de citoquinas inflamatorias y de la capacidad de proliferación de linfocitos T CD4⁺ en células dendríticas maduras. Sin embargo, son necesarios estudios *in vivo* que permitan profundizar en los efectos de la activación de los receptores LXR en células dendríticas de procedencia variada.

OBJETIVOS

Los receptores nucleares LXR son claves en la regulación del metabolismo del colesterol en múltiples tejidos. Además, nuestro grupo ha descrito en el pasado que los receptores LXR actúan como reguladores negativos de la expresión de genes inflamatorios. Actualmente, el papel de LXR en la respuesta inmune adquirida está poco estudiado. En este sentido, estos receptores están mejor caracterizados en la biología de los macrófagos, relacionados con procesos como la inflamación y aterosclerosis, pero hasta el momento existen pocos estudios acerca de la relación entre LXR y otras células del sistema inmune, como las células dendríticas.

Las células dendríticas representan un sistema único como sensores de patógenos, con una gran capacidad para activar eficientemente los linfocitos T *naive*. Como las APC más potentes, estas células poseen un papel crucial frente a infecciones, así como en cáncer y diferentes enfermedades inflamatorias. Estas características de la biología de las células dendríticas, unidas al papel regulador de LXR sobre el metabolismo lipídico y la función inmune, permiten establecer la hipótesis de que la actividad de los receptores LXR puede ser relevante en diversos aspectos de la biología de las células dendríticas.

Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo general de esta Tesis consistió en el análisis de las interacciones de los receptores LXR en la biología de las células dendríticas. En concreto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la posible regulación transcripcional dependiente de LXR de los fenómenos de diferenciación y maduración, mediante el estudio del comportamiento de estas células en ausencia funcional de LXR. Para ello, nos propusimos: A) Caracterizar las poblaciones celulares procedentes del cultivo

de células dendríticas de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. B) Realizar la descripción fenotípica de las células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}.

- Caracterizar de los receptores nucleares LXR en las células dendríticas, incluyendo: A) El estudio de la expresión de las isoformas LXR α y LXR β en estas células. B) El análisis de la actividad transcripcional de LXR en células dendríticas, mediante el análisis del patrón de expresión de diferentes genes diana de LXR.
- Investigar las poblaciones celulares de los órganos linfoides secundarios de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, a través del estudio de la distribución tisular de las células dendríticas y de otros tipos celulares del sistema inmune.
- Estudiar la funcionalidad de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, analizando A) la capacidad para captar antígenos *in vitro*, mediante ensayos de endocitosis. B) el potencial migratorio de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, empleando modelos establecidos de ensayos de migración, *in vivo* e *in vitro*.
- Explorar la expresión y las posibles vías de señalización del receptor CCR7 en las células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}.
- Determinar la regulación transcripcional mediada por los receptores LXR en células dendríticas de origen murino, mediante el uso de microarrays. A) Analizando la regulación de genes dependientes del estado de activación de las células dendríticas en ambos genotipos. B) Estudiando la posible regulación de genes tras la activación de los receptores LXR en las células dendríticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Se emplearon ratones pertenecientes a la cepa C57BL6/Sv129 fondo mixto, de entre 8 y 10 semanas de edad, de genotipo diferentes genotipos: ratones de genotipo salvaje (WT) y ratones deficientes en ambas isoformas de LXR ($LXR\alpha\beta^{-/-}$).

Estos ratones fueron amablemente cedidos por el Dr. David Mangelsdorf (U. Texas Southwestern, USA) (Peet et al., 1998). Todos los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura, permitiéndoles el acceso *ad libitum* a agua y comida, así como libres de patógenos, en las instalaciones del animalario de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Todos los estudios llevados a cabo con animales siguieron la normativa del comité de ética y bienestar animal de la ULPGC.

2. Cultivo de líneas celulares y transfecciones

Durante la realización de este trabajo se emplearon cultivos primarios de células de origen murino, así como líneas celulares murinas. La manipulación de los ratones para la obtención de células primarias se llevó a cabo conforme a las normas del comité de ética y bienestar animal de la ULPGC.

2.1. Cultivo de células dendríticas

2.1.1. Obtención y diferenciación de células dendríticas derivadas de progenitores procedentes de médula ósea de ratón

La obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón se realizó siguiendo una versión adaptada de protocolos previamente establecidos

(Lutz et al., 1999). Los ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ se sacrificaron mediante anestesia con sevoflurano (ABBOTT), y las extremidades traseras se amputaron a la altura de la cadera de ratones de 8-10 semanas. Después de retirarse piel y músculos, los huesos limpios se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*, PAA Laboratories GmbH) y antibióticos (Penicilina-Estreptomicina, Biowhittaker®, Lonza), y se conservaron en frío (4°C) hasta ser procesadas.

Se seleccionaron fémur y tibia, se separan de la rótula y, después de seccionar los extremos de ambos huesos, se les inyecta medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de FBS a través de uno de los extremos usando una jeringuilla de 10 ml y una aguja de 0.6 mm de diámetro. El proceso se repitió hasta que el interior del hueso quedó libre de células de la médula. El medio obtenido se filtró a través de un separador celular de Nylon, con un poro de 70 μm de tamaño (BD Falcon™, BD Bioscience) y se lavó con PBS (*Phosphate Buffered Saline* pH 7.4) para eliminar posibles restos de tejidos. La suspensión celular se centrifugó a 1500 r.p.m. a 4°C durante 5 minutos, y el precipitado celular se resuspendió e incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente en una solución hipotónica con respecto a los eritrocitos (*Red Blood Lysis Buffer*, Sigma). Después de añadir RPMI 1640 al 10% de FBS, para prevenir la lisis del resto de células, las muestras se lavaron dos veces con PBS, y finalmente se sembraron (5×10^6 células) en placas Petri bacteriológicas, en 10 ml de medio RPMI 1640 completo (penicilina (100 U/ml, Sigma), estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$), L-glutamina (2 mM), 2-mercaptoetanol (50 μM , Sigma-Aldrich) y FBS 10%), enriquecido con la citoquina de ratón GM-CSF 200 U/ml (20 ng/ml (5×10^6 U/mg; Peprotech, Alemania), para favorecer la diferenciación de estos progenitores a células dendríticas (Lutz et al., 1999). Las

células se mantuvieron en estas condiciones hasta que estuvieron totalmente diferenciadas (5-7 días), añadiendo medio nuevo en los días 4 y 6, junto con GM-CSF, para la completa diferenciación de las células dendríticas. Después de este periodo, se indujo la maduración de las células suplementando el medio con 500 ng/ml de LPS (LPS de *E. coli* Serotipo 055:B5, Sigma) durante 24 horas. Las células no adherentes se recogieron después de 8 días de cultivo y se procedió a su utilización.

El análisis de las células mediante citometría de flujo reveló que el 80-90% de las mismas expresaban el epítipo CD11c, considerado marcador de células dendríticas. Para la activación del heterodímero LXR/RXR, las células se trataron en los días 5 y 7 del periodo de diferenciación, con los ligandos sintéticos GW3965 (1 μ M, *GlaxoSmithKline*) y LG268 (100 nM, *Ligand Pharmaceuticals*).

Para analizar las características morfológicas de estas células se depositó una pequeña alícuota de suspensión celular sobre un portaobjetos empleando la citocentrífuga (*Shandon CytoSpinIII Cyto centrifuge*). Se realizó una tinción rápida de las muestras (Kit de tinción rápida en hematología, Panóptico, Panreac), seguida de observación mediante microscopía de luz convencional.

2.1.2. Obtención de células dendríticas a partir de bazo de ratón

Los bazos de los ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} se cortaron en pequeños fragmentos y se sometieron a digestión con *Liberase CI* (1 ml/bazo de 1.67 *Wunsch* unidades/ml; Roche Applied Science) y *DNase I* (0.2 mg/ml; Roche Applied Science) en RPMI 1640 1% de FBS durante 30 minutos a 37°C en agitación. Los últimos 5 minutos se añadió EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) 10 mM, y se pipeteó la suspensión celular varias veces para homogeneizar bien toda la

preparación y frenar la acción de las enzimas. Posteriormente, las células se lavaron una vez en PBS/EDTA 2 mM, al 1% FBS, y la suspensión celular resultante se filtró usando un separador celular de Nylon, con un poro de 70 μm de tamaño (BD FalconTM, BD Bioscience). Después de dos lavados con PBS, se lisaron los glóbulos rojos como se detalló en el apartado anterior.

El enriquecimiento de la suspensión celular en células dendríticas se realizó mediante la incubación de la misma con microesferas inmunomagnéticas acopladas al anticuerpo CD11c, y posterior selección positiva en columnas magnéticas MS⁺, siguiendo las instrucciones del fabricante (MACS, Miltenyi Biotec). Las células fueron sembradas en placas de cultivo en medio RPMI 1640 al 10% FBS y antibióticos, y luego se trataron durante 24 horas con el ligando GW3965 (1 μM) o vehículo (DMSO). Posteriormente, las células se trataron con LPS (500 ng/ml) para inducir la maduración.

2.1.3. Transfección de células dendríticas

Las células dendríticas de bazo de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/- aisladas como se ha descrito anterior, se sometieron a maduración durante 24 horas con LPS (500 ng/ml), y posteriormente se realizó la sobre-expresión transitoria de CD38 o GFP (*green fluorescent protein*) con el kit específico para células dendríticas de ratón (*Amaxa[®] Mouse Dendritic Cell Nucleofector Kit*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la transfección se determinó mediante el conteo de células dendríticas esplénicas GFP⁺ y posterior comprobación al microscopio de fluorescencia, y fue de aproximadamente el 50-60%.

2.2. Cultivo de la línea celular mieloide RAW 264.7

Para la realización de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se empleó la línea celular mieloide RAW264.7 que sobreexpresa LXR α , modelo previamente validado en nuestro laboratorio para experimentos de ChIP (Alonso-González et al., 2009). Las células se sembraron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma, España) suplementado con 10% de FBS. Previo a los tratamientos con los ligandos sintéticos (GW3965, 1 μ M, y LG268, 100 nM), las células RAW264.7-LXR α se lavaron con PBS y se reemplazó el medio de cultivo por RPMI 1640 suplementado con 0.5% FBS. Estas células se emplearon en las 24 horas siguientes.

3. Histología

3.1. Recogida y conservación de muestras

La extracción de los ganglios linfáticos y bazo se hizo de manera rápida con el fin de preservar su estructura y características moleculares. Para conservar los tejidos congelados, una vez extraídos del animal, se colocaron en moldes para histología, desechables (Lab-box), que contenían *OCTTM Compound* (Tissue-Tek[®] Sakura), un polímero que solidifica a -20°C y preserva la estructura del tejido. Inmediatamente después de colocar el tejido en el molde con el OCT, se tomó con unas pinzas y se sumergió en isopentano frío en nieve carbónica, congelándose rápidamente. Estos moldes de tejido se conservaron a -80°C.

3.2. Obtención de criosecciones

Los cortes histológicos se obtuvieron a partir de los bloques de tejidos congelados, utilizando un criostato (Tissue-Tek® Cryo3®, Sakura) con el fin de conseguir criosecciones de un grosor de 4-8 μm . Los cortes, recogidos sobre portaobjetos (*Superfrost® plus*, Thermo Scientific), fueron secados al aire durante unos minutos antes de proceder a la tinción histológica o, de nuevo, conservarse a -80°C .

4. Análisis de la expresión de proteínas

Se utilizaron distintas técnicas para la detección de proteínas en función de la procedencia de la muestra y la finalidad de la técnica (cuantificación, localización tisular, sublocalización celular o identificación de proteínas). En la tabla M1 se muestran los anticuerpos empleados, la procedencia de los mismos y la dilución utilizada para cada uno de los experimentos de citometría de flujo (FC), inmunocitoquímica (ICQ), e inmunofluorescencia (IF). En las tablas M2 y M3 se detallan los anticuerpos empleados en la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y *Western-Blot* (WB), respectivamente.

Tabla M1. Dilución de trabajo de los anticuerpos empleados en los experimentos de citometría de flujo (FC), inmunocitoquímica (ICQ), e inmunofluorescencia (IF).

ANTICUERPO	PROVEEDOR	DILUCIÓN	DILUCIÓN	DILUCIÓN
		FC	ICQ	IF
Rat anti-B-220	Caltag	1:100	—	1:300
Rat anti-B-220-FITC	eBioscience	1:50	—	1:50
Rat anti-CCR7_APC	BD Pharmingen	1:10	1:10	—
Rat anti-CCR7_PE	BD Pharmingen	—	1:10	—
Rat anti-CD4	BD Pharmingen	—	—	1:300
Rat anti-CD8	BD Pharmingen	—	—	1:200
Hamster anti-CD11c_FITC	BD Pharmingen	1:10	1:10	1:10
Rat anti-CD38	eBioscience	1:50	1:100	—
Hamster anti-CD69	eBioscience	1:100	—	—
Hamster anti-CD80	eBioscience	1:100	—	—
Rat anti-CD86	eBioscience	1:100	—	—
Rat anti-F4/80	Cedido amablemente por Dr. Siamon Gordon	—	—	1:50
Rabbit anti-Laminin	Sigma Aldrich	—	—	1:400
Rat anti-MadCAM-1	eBioscience	—	—	1:5
Rat anti-MHC_FITC	eBioscience	1:50	1:100	1:100
Rat anti-MHC_PE	eBioscience	1:50	1:100	1:100
Rat anti-Sialoadhesine	Cedido amablemente por Dr. Siamon Gordon	—	—	1:100
Goat anti-rabbit IgG_Alexa Fluor® 647	Invitrogen	1:500	—	1:500
Goat anti-rat IgG_Alexa Fluor®488	Invitrogen	1:500	1:500	1:500
Goat anti-rat IgG_Alexa Fluor®488	Invitrogen	1:500	1:500	1:500

4.1. Análisis de la expresión de proteínas en células intactas por citometría de flujo

El análisis de proteínas de membrana por citometría de flujo constituye un método eficaz y preciso, que permite cuantificar y comparar la expresión de determinados marcadores celulares entre varias muestras. Además, permite identificar poblaciones celulares que difieren en el patrón de expresión de determinadas moléculas.

La mayoría de las tinciones realizadas en esta tesis para la citometría de flujo se realizaron en células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$, maduras e inmaduras (ver apartado 2.1.1 Material y Métodos). Las células se contaron en una cámara de *Neubauer* y se tomó el volumen correspondiente a 10^6 células, aproximadamente. Tras lavar las células con FACS Buffer, suplementado con 1% de BSA (*bovine serum albumin*), 0.01% de NaNH_3 y 1% de FBS en PBS, la suspensión celular se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo primario a la dilución indicada (ver tabla M1), a 4°C y en oscuridad. Tras realizar un lavado con FACS Buffer, las células se incubaron con el anticuerpo secundario (en el caso de no haber empleado un anticuerpo primario no acoplado a fluoróforo) de la misma manera que el primario, y se realizó un último lavado con FACS Buffer. Por último, las células se resuspendieron en PBS y fueron cuantificadas en el citómetro de flujo Coulter EPICS XL MCL (Beckman Coulter). En todos los casos, se normalizó la expresión de los marcadores celulares usando un isotipo control de la especie en la que se hubiera generado el anticuerpo. Los datos fueron analizados con el programa WinMDI 2.8.

4.2. Análisis de la expresión de proteínas en células en cultivo: Inmunocitoquímica

Para la inmunodetección de proteínas en cultivos celulares, células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/- se cultivaron de manera rutinaria sobre cubreobjetos de cristal, tratados previamente con polilisina (Thermo). Antes de comenzar con la tinción inmunofluorescente, se realizaron tres lavados con PBS para retirar los restos de medio de cultivo en las muestras. Tras los lavados, se procedió a la fijación de las células con paraformaldehído 4% en PBS, durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Con el fin de eliminar posibles restos de fijador en las células, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS, a temperatura ambiente y en agitación. Las células se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente, con la solución de bloqueo (PBS al 6% de BSA, 2% de suero normal de cabra), para evitar la unión del anticuerpo primario a epítomos inespecíficos. El anticuerpo primario se incubó según la dilución indicada (ver tabla M1) en solución de bloqueo diluida 1:2 en PBS, durante toda la noche a 4°C. Tras realizar tres lavados con PBS, los cubreobjetos con las células se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente y en oscuridad, con el anticuerpo secundario acoplado a una molécula fluorescente (ver tabla M1).

Finalmente, las células se lavaron tres veces con PBS y se procedió al montaje con un medio que incluye DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) (*Vectashield Mounting Medium with DAPI*, Vector Laboratories), colorante que se acopla específicamente al ADN, tiñendo de color azul los núcleos celulares. La adquisición y procesamiento de las imágenes se efectuó mediante el sistema de

microscopía de fluorescencia y confocal LSM 5 PASCAL *Lasser Scanning Microscope* (Zeiss) y el programa LSM 5 *Image Examiner*.

4.3. Tinción inmunorreactiva en tejidos: Inmunofluorescencia en cortes de tejidos congelados

La inmunohistología es el abordaje más preciso y comúnmente empleado para la detección y localización de proteínas en tejidos. Mediante el uso de anticuerpos específicos y la posterior detección con anticuerpos secundarios, es posible saber en qué región o en qué tipo celular de una muestra tisular se expresa una proteína determinada. Con el objetivo de localizar la posición relativa de las células dendríticas en relación al resto de poblaciones celulares que se encuentran en el entramado celular de los órganos linfoides secundarios, se realizaron tinciones dobles y triples sobre secciones de bazo y ganglios linfáticos obtenidos como se describió en el apartado 3 de Material y Métodos, usando los diferentes anticuerpos indicados en la tabla M1.

La inmunofluorescencia se basa en la detección de antígenos en los tejidos mediante la utilización de anticuerpos que están acoplados a moléculas fluorescentes. Estos anticuerpos acoplados a moléculas fluorescentes pueden ser anticuerpos dirigidos al epítipo de interés, o bien anticuerpos secundarios que se usan para revelar la presencia del anticuerpo primario dirigido contra el epítipo de interés. El desarrollo de la tinción inmunofluorescente consistió en un primer paso de fijación que se llevó a cabo de dos maneras, dependiendo de las características del epítipo deseado. La fijación con acetona fría (-20°C), durante uno o dos minutos, permite permeabilizar el tejido, a la vez que se fija. En algunos casos, se utilizó la fijación con paraformaldehído al 4% en PBS, que se lleva a cabo a

temperatura ambiente durante una hora. Los grupos aldehído del paraformaldehído pueden reaccionar con algunos epítomos en el tejido y “enmascarar” el antígeno, por lo que, en la mayoría de los casos, se optó por la fijación con acetona fría. En ambos métodos y tras la fijación de los tejidos, se realizaron tres lavados, de cinco minutos cada uno, con PBS-T (PBS con 0,1% de Tritón X-100, un detergente empleado con el fin de permeabilizar las células), y se realizó el bloqueo de las muestras con PBS-T al 6% de BSA y 2% de suero normal de cabra.

La reacción con el anticuerpo primario (ver tabla M1) se llevó a cabo con el anticuerpo diluido a la concentración deseada en la solución empleada para el bloqueo, diluida 1:2 en PBS. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó en una cámara húmeda, durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en función de las características de cada epítomo o anticuerpo. Tras realizar tres lavados con PBS-T, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante una hora, a temperatura ambiente. En algunos casos, se realizó un doble marcaje, para lo que, tras la incubación con el secundario, se hizo otra incubación con el segundo anticuerpo de interés acoplado a moléculas fluorescentes.

Finalmente, para la conservación de la tinción, se utilizó el medio de montaje DAPI, y los tejidos se analizaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia LSM 5 PASCAL *Lasser Scanning Microscope* (Zeiss) y con el programa *LSM 5 Image Examiner*.

4.4. Estudio de las interacciones proteína:ADN mediante ensayo de retardo en gel (EMSA)

El ensayo EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) permite analizar la existencia de proteínas nucleares, o proteínas sintetizadas *in vitro*, capaces de unirse a una secuencia específica de ADN, *in vitro*. Las proteínas unidas específicamente a un fragmento de ADN, marcado radiactivamente, retardan la movilidad del fragmento durante su electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Esencialmente, el ensayo de retardo en gel se realizó como se describió previamente (Laffitte et al., 2001). El oligonucleótido correspondiente con el sitio LXRE del promotor murino de CD38 (5'-GATCTCAGTGACCTTAAATGACCTGGCA-3') (50 nM) se hibridó con su secuencia complementaria por incubación en tampón durante 5 minutos a 85°C y posterior enfriamiento lento. Los oligonucleótidos hibridados (100 ng) se marcaron en los extremos 3' con el fragmento *Klenow* de la enzima ADN polimerasa I en presencia de 50 µCi de [α -³²P]dCTP y los restantes dNTP no marcados, en un volumen final de 20 µl. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C, la sonda marcada se purificó en columnas *Micro Spin G-25* (Amersham), siguiendo las indicaciones del fabricante. La actividad de la sonda se cuantificó en un contador beta con líquido de centelleo.

El análisis de las interacciones proteína-ADN requiere que se formen complejos estables *in vitro*. La reacción de unión proteína-ADN se llevó a cabo incubando 1 µg de las proteínas de ratón LXR α , LXR β y RXR α , sintetizadas a partir del kit *TnT[®] T7 quick-coupled transcription/translation System* (Promega) durante 30 minutos a 4°C, en presencia de 5 x 10⁴ c.p.m. de la sonda de ADN y 2 µg de poly(dI-dC), en un tampón de unión que contiene glicerol al 10%, EDTA 0.2 mM,

NaCl 0.1 M, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM y HEPES 20 mM pH 8, en un volumen final de 20µl.

Los complejos proteína-ADN se separaron de la sonda libre mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante al 5%, siendo la proporción acrilamida/bisacrilamida de 38:2, previamente sometido a 150 V a 4°C durante al menos 1 hora. El proceso de migración de las muestras se realizó a 150 V durante 2.5 horas en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 4.4 mM, EDTA 0.1 mM pH 8). Los geles se fijaron con glicerol al 20% y secaron sobre papel *Whatman 3MM* en un secador de geles (*Gel Dryer*, Bio-Rad) a 80°C durante 1-2 horas. El gel seco se expuso a una película *Hyperfilm* (Amersham), durante 10-24 horas a -80°C.

Las proteínas presentes en los complejos proteína-ADN se identificaron mediante el uso de anticuerpo específicos (*"supershift"*). Se añadió 1 µg de anticuerpo a la reacción de unión, previamente a la adición de la sonda, y se incubó durante 1 hora a 4°C. Si la proteína presente en el complejo es reconocida por el anticuerpo se forma un complejo ternario anticuerpo-proteína-ADN, resultando en una mayor reducción de la movilidad del complejo. Se emplearon anticuerpos contra RXRα y un anticuerpo control (IgG). Para llevar a cabo la reacción de competición se pre-incubó el competidor (oligonucleótidos en exceso no marcados) con las proteínas a 4°C 30 minutos, y posteriormente se añadió la sonda y se incubó 30 minutos más a temperatura ambiente.

4.5. Inmunoprecipitación de proteínas mediante ChIP

La inmunoprecipitación de la cromatina o ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*) es una técnica utilizada para determinar si una proteína concreta se une a o está asociada a una secuencia específica de ADN. Las etapas básicas de esta técnica se muestran en la figura M1 y se detallan a continuación:

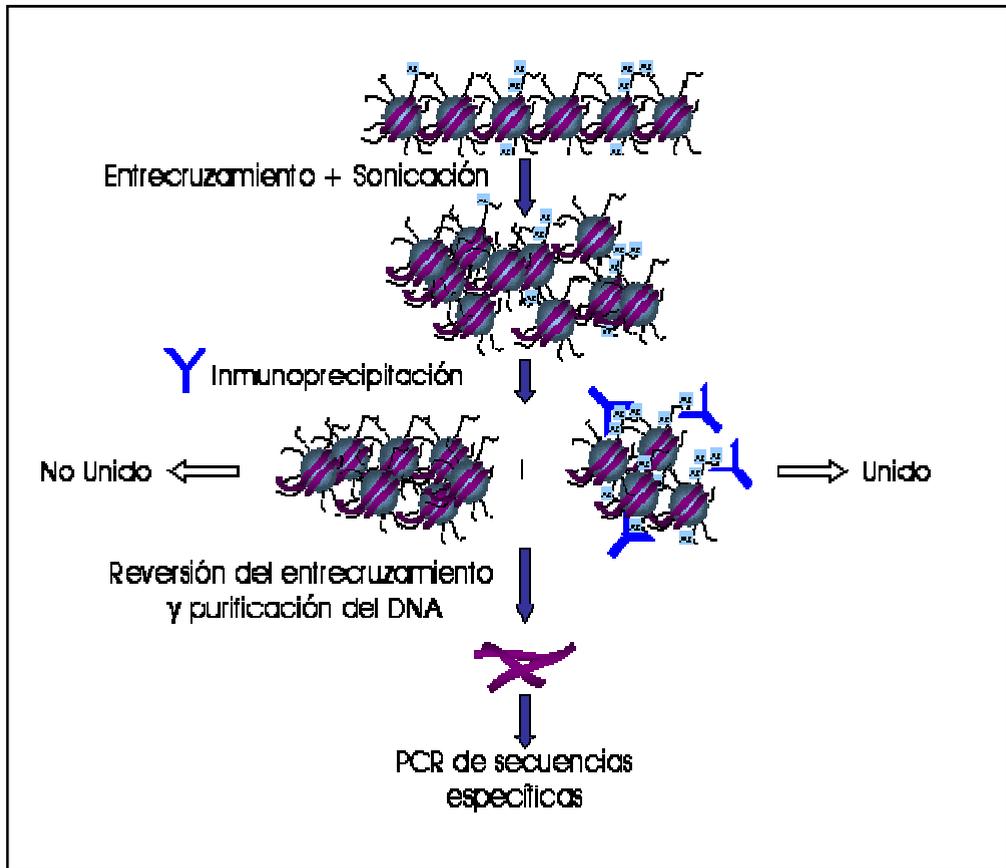


Figura M1.- Las proteínas asociadas a una secuencia de ADN se entrecruzan con formaldehído al ADN *in vivo*, y son fragmentadas por sonicación. Posteriormente, estas proteínas unidas al ADN son inmunoprecipitadas, y se revierte el entrecruzamiento para liberar el ADN. Por último, mediante qPCR se amplifican secuencias específicas.

- Entrecruzamiento *in vivo* (*cross-linking*) mediante formaldehído del ADN con las proteínas asociadas, para fijar las interacciones proteína-proteína y las interacciones proteína-ADN.
- Aislamiento de la cromatina y fragmentación del complejo ADN-proteína.
- Inmunoprecipitación de los complejos ADN-proteína con anticuerpos específicos para aislar el complejo formado, reversión del *cross-linking* y purificación del ADN.
- Amplificación por qPCR de secuencias específicas.

La técnica se realizó siguiendo un protocolo modificado a partir del publicado por Hecht y Grunstein (Hecht and Grunstein, 1999).

4.5.1. Cultivo, tratamiento y fijación de las células

Para la realización de esta técnica de ChIP se empleó la línea celular mieloide RAW264.7 que sobreexpresa LXR α . Las células RAW-LXR α se cultivaron como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.2. La fijación de ADN y las proteínas asociadas se obtuvo mediante la incubación con formaldehído 1% (37% formaldehído, 5M NaCl, 0,5M EDTA, 50mM EGTA, 1M HEPES pH 8,0) durante 10 minutos, añadiendo directamente 1/10 del volumen de medio de cultivo, tras la incubación con GW3965 (1 μ M) o dimetilsulfóxido (DMSO) durante 90 minutos. La reacción (*cross-linking*) se paró con glicina 2,5 M (*Glycine*, Sigma) durante 5 minutos, y después se retiró el medio. Se lavaron las placas de cultivo tres veces con PBS frío, y se levantaron las células con un raspador en 3 ml de PBS. Las células se llevaron a un tubo cónico de 15 ml y se lavaron tres veces más, centrifugando 5 min a 2500 r.p.m. (a 4°C), entre cada lavado. El precipitado de células se congeló en un tubo de 1,5 ml con hielo seco y metanol, y se mantuvo a -80°C hasta el día siguiente.

4.5.2. Preparación de los extractos de cromatina

Se descongelaron las células y se resuspendieron en 400 μ L de tampón de lisis (50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% Tritón X-100, 0.1% *sodium deoxycholate*, 0.1% SDS y cóctel de inhibidor de proteasas, *Complete protease inhibitor cocktail*, Roche), añadidas en el momento de uso. La cromatina se fragmentó mediante ultrasonidos (12 pulsos de 15 segundos) para obtener fragmentos de ADN de 300-1000 pares de bases, con un sonicador (Bioruptor™, Diagenode). Se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos. Se guardó un 5% del sobrenadante a 4°C, para utilizarlo posteriormente como control de carga (*input*). El lisado se diluyó 10 veces con 600 μ l de tampón de dilución (1% Tritón X-100, 2 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8 e inhibidores de proteasas). El sobrenadante se diluyó y se emplearon 25 μ g de cromatina diluida fragmentada para cada precipitación.

4.5.3. Inmunoprecipitación

Antes de la inmunoprecipitación se realizó un “inmuno-aclarado” de la cromatina, añadiendo bolas magnéticas con Proteína A/Proteína G (*Dynabeads Protein A*, *Dynabeads Protein G*, Invitrogen, Dynal G), durante 2 horas a 4°C con rotación. Tras las 2 horas de aclarado, las bolas magnéticas que no estaban unidas específicamente a los fragmentos de cromatina se eliminaron. Las fracciones de cromatina “inmuno-aclaradas” se inmunoprecipitaron durante 12-18 horas a 4°C con rotación con los anticuerpos AcH3, CBP, NCoR, RXR α e IgG, de los proveedores y a las diluciones que se indican en la siguiente tabla:

Tabla M2.- Dilución de trabajo de los anticuerpos empleados en los experimentos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

ANTICUERPO	PROVEEDOR	Dilución ChIP
AcH3	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
CBP	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
NCoR	Affinity Bioreagents	1:1000
RXRα	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:1000

Posteriormente, los inmuno-complejos fueron precipitados con las bolas magnéticas con Proteína A/Proteína G pre-bloqueadas durante 2-3 horas a 4°C con rotación. Los complejos precipitados se lavaron con los siguientes tampones: tampón con baja concentración de sales (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA pH 8, NaCl 150 mM, 20 mM Tris-HCl pH 8), tampón con alta concentración de sales (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8), y tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA). Finalmente, los inmuno-complejos se eluyeron con tampón de elución (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) por rotación, durante 20 minutos a temperatura ambiente.

La cromatina inmunoseleccionada se incubó a 65°C toda la noche con tampón de extracción para revertir el entrecruzamiento proteína:ADN que realizó el formaldehído. Posteriormente, las muestras se trataron con RNAsa A (10 mg/ml, Sigma), durante 2 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se añadió proteinasa K (20 mg/ml, Invitrogen) y se incubó otras 2 horas a 37°C. A continuación, el ADN se purificó con un kit de purificación (G&E Healthcare). El ADN purificado se disolvió

en 100 μ l de tampón de elución, y se utilizaron 5 μ l para analizar los resultados de la inmunoprecipitación por PCR cuantitativa en tiempo real (ver apartado 6.2. de Material y Métodos). Se diseñaron parejas de cebadores específicos para amplificar las regiones promotoras de los genes CD38 y SREBP1c, donde fueron localizados los elementos reguladores de LXR (ver tabla M3).

Tabla M3.- Secuencias específicas de los cebadores utilizados en los ensayos de qPCR.

GEN	SECUENCIA ESPECÍFICA DEL CEBADOR CHIP
CD38	Sentido: 5'- AAA ACT TCT CCA TTC CAT CTG TTA CA -3'
	Anti-sentido: 5'-CAT GTG TGT CCA AGG CAT TAA AC -3'
SREBP1c	Sentido: 5'- TGG ATC TGT ACA CTT TAC ACA GTT CCA-3'
	Anti-sentido: 5'-CCC GGT TTT CTG AAA ACT CAA A-3'

4.6. Estudio de las proteínas por *Western-Blot*

4.6.1. Preparación de los extractos proteicos

Para estudiar las rutas intracelulares que regulan la supervivencia y quimiotaxis dependiente de CCR7, las células dendríticas maduras derivadas de progenitores procedentes de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/- (10⁶ células por condición) se cultivaron con el vehículo control o con las quimioquinas correspondientes (CCL19 o CCL21), durante diferentes periodos de tiempo. La estimulación finalizó con la lisis de las células en 100 μ l de tampón A (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 120 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 1 mM pirofosfato sódico, 20 mM fluoruro sódico, 1 mM ortovanadato sódico, y un cóctel de

inhibidor de proteasas (*Complete protease inhibitor cocktail*, Roche). Los sobrenadantes se mezclaron con el tampón de muestra 5x para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.05 mM *sodium orthovanadate*, 3% SDS, 1 mM EDTA, 2% 2-mercaptoetanol, y 5% glicerol) y se hirvieron. La determinación de la concentración proteica de cada muestra se realizó según el método BCA (ácido bicinónico), donde los cambios de absorbancia a 562 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente (Smith et al., 1985).

4.6.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas se fraccionaron electroforéticamente en presencia del detergente SDS, que permite separar proteínas en función de su peso molecular. Los geles de poliacrilamida se prepararon con un porcentaje de reticulación entre 6% y 10%, en función del peso molecular de la proteína de interés, con una proporción 29:1 de acrilamida-bisacrilamida. La electroforesis se realizó en cubetas Mini Protean II® (Bio-Rad), y el tampón de electroforesis contenía glicina 1.25 M, Tris-HCl 12 mM y SDS 0,2%. La resolución electroforética tuvo lugar a un potencial constante de 120 V.

4.6.3. Análisis de expresión proteica mediante *Western-Blot*

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Blot transfer Medium*, Bio-Rad Laboratories), a un amperaje constante de 250 mA, durante 3 horas, a 4°C, en un medio de transferencia constituido por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3. Posteriormente, las membranas se incubaron durante una hora, a temperatura

ambiente, con una solución que contenía leche desnatada al 5% disuelta en TBS (Tris-HCl, 50 mM pH 7.4, NaCl 200 mM), con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. El anticuerpo primario (ver tabla M4) se diluyó en solución de bloqueo diluida 1:2 y las membranas se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de cinco minutos con TBS-T (TBS con el detergente Tween-20 al 0,1%). A continuación, las membranas se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo que lleva acopladas moléculas de peroxidasa de rábano (*Horseadish peroxidase*, HRP).

Tabla M4.- Dilución de trabajo de los anticuerpos empleados en los experimentos de *Western-Blot* (WB).

ANTICUERPO	PROVEEDOR	Dilución WB
pERK1/2	Cell Signaling Technology	1:1000
ERK1/2	Cell Signaling Technology	1:1000
p-AKT	Cell Signaling Technology	1:1000
β-Actina	Cell Signaling Technology	1:5000

Por último, las membranas se revelaron mediante ECL (*Enhanced Chemiluminescence Plus*, Amersham™), de manera que las proteínas reconocidas por el anticuerpo primario y posteriormente por el secundario estarán acopladas a moléculas de peroxidasa que reaccionan con el luminol. Este compuesto emite luminiscencia al oxidarse, que puede ser revelada por la exposición en una película fotosensible.

5. Estudio de la capacidad endocítica de las células dendríticas frente al antígeno dextrano

Para medir la capacidad endocítica de las células dendríticas se emplearon moléculas de dextrano (peso molecular 40,000, Sigma), polisacárido complejo formado por numerosas moléculas de glucosa, presente en diferentes bacterias, y acopladas al fluoróforo Alexa Fluor® 594 (*Dextran Alexa Fluor 594*, Molecular Probes, Invitrogen).

El dextrano es una molécula hidrofílica que es captada por las células dendríticas inmaduras mediante endocitosis mediada por el receptor de manosa (Sallusto et al., 1996). El fluoróforo Alexa Fluor® 594 es un marcador fluorescente que se detecta mediante microscopía confocal. Las células dendríticas inmaduras obtenidas a partir de progenitores procedentes de la médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} (0.5×10^6) se incubaron con 1 mg/ml de Alexa Fluor® 594 –dextrano, a 37°C durante 30 minutos en PBS. Como marcador de células dendríticas se empleó el anticuerpo CD11c. La unión no específica de dextrano a las células dendríticas se determinó mediante la incubación de las células con Alexa Fluor® 594 -dextrano a 4°C durante 30 minutos. El proceso de endocitosis se finalizó realizando tres lavados con azida sódica 0.1% PBS, 1% FBS a 4°C. Las células se analizaron mediante microscopía confocal LSM 5 PASCAL *Lasser Scanning Microscope* (Zeiss) y el programa LSM 5 *Image Examine*. El análisis mediante microscopía confocal permitió identificar las células dendríticas que habían captado moléculas de dextrano.

6. Análisis de la expresión de ARN

6.1. Extracción de ARN

Las muestras de ARN que se utilizaron en los experimentos procedieron de células dendríticas (8×10^6) cultivadas *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Las células se lavaron con PBS frío, y se homogeneizaron con TRIZOL[®] (Invitrogen), un reactivo que incorpora una mezcla estable de fenol, GuSCN (*guanidinium isothiocyanate*), colorante y estabilizantes, que facilitan la extracción de ARN. Se empleó según las instrucciones del proveedor, y el homogeneizado se transfirió a tubos de polipropileno de 1,5 ml. Una vez en los tubos, se añadió a cada muestra 200 μ l de cloroformo frío y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras se mantuvieron 15 minutos a 4°C y se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 r.p.m., y de nuevo se mantuvieron a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadió un volumen igual de isopropanol frío. A continuación, las muestras se mantuvieron durante 1 hora a -80°C con el fin de precipitar el ARN. De nuevo, se centrifugaron las muestras 15 minutos a 13000 r.p.m. y a 4°C, y se aspiró el sobrenadante con cuidado. El precipitado se lavó con etanol 75% frío y finalmente se resuspendió en agua ultrapura estéril. El ARN extraído se resolvió en geles 1.5% de agarosa para determinar la calidad del mismo, visualizándolo en un transiluminador UVA, y se cuantificó mediante la absorción de los nucleótidos a una determinada longitud de onda, usando un espectrofotómetro ND-1000 (*Spectrophotometer*, NanoDrop Technologies).

6.2. Análisis de ARN mensajero por RT-qPCR

Se utilizó la técnica de RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) para cuantificar los niveles relativos de ARN mensajero

(ARNm) de los genes de interés en cada experimento. Para ello se diseñaron unos cebadores específicos para amplificar cada gen, cuyas secuencias específicas se muestran en la tabla M5.

La técnica de RT-qPCR comprende una primera fase de retrotranscripción de ARN o síntesis de ADN complementario (ADNc), y una segunda fase de amplificación del fragmento de ADNc con los cebadores específicos. Para realizar la retrotranscripción se usó 1µg de ARN y se utilizó el kit “*iScript cDNA Synthesis Kit*” (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar la RT-qPCR se utilizaron 2,5 ng de ADNc de cada muestra, 0,3 µM de los cebadores específicos y 10 µl del cóctel SYBR® Green PCR Master Mix (SYBR Green 2X, Diagenode), y en todo momento se siguieron las indicaciones del proveedor y se emplearon las condiciones óptimas para cada pareja de cebadores. Toda la mezcla de la reacción fue amplificada en un termociclador (iQTM5, *Multicolor Real-Time PCR Detection System*, BioRad), y los datos se analizaron con *iQ5 Software Data Analysis* (BioRad). La expresión de los genes estudiados se normalizó con la expresión del gen 36B4.

En el caso de la técnica ChIP, para la determinación de la cantidad relativa de ADN se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$ (*Applied Biosystems User Bulletin 2*). Una vez obtenida la Ct media para cada muestra, se normalizó la Ct de cada muestra con la Ct de su correspondiente carga. Las diferencias de Ct normalizada entre los distintos tratamientos se expresaron como porcentajes de la carga. Dado que la carga representa el 5% de la muestra inicial (no precipitada), se calculó el porcentaje respecto al 100% de la carga, tanto para las muestras precipitadas con anticuerpos específicos, como para los controles negativos con IgG.

Tabla M5.- Secuencias específicas de los cebadores utilizados en los ensayos de qPCR. Los oligonucleótidos fueron diseñados usando el programa Primer Express™. En todos los casos los cebadores se diseñaron para muestras de origen murino.

GEN	SECUENCIA ESPECÍFICA DEL CEBADOR qPCR
ABCA1	Sentido: 5'- GCA GAT CAA GCA TCC CAA CT-3'
	Anti-sentido: 5'-CCA GAG AAT GTT TCA TTG TCC A-3'
ABCG1	Sentido: 5'-TCA CCC AGT TCT GCA TCC TCT T-3'
	Anti-sentido: 5'-GCA GAT GTG TCA GGA CCG AGT-3'
CCR7	Sentido: 5'- CAG GGA AAC CCA GGA AAA AC -3'
	Antisentido: 5'- ATC TG GCA GAA GCA CAC CT -3'
CD38	Sentido: 5'- TGG ACC CAA ATA AGG TTC ATA AAC T-3'
	Anti-sentido: 5'- CGT TAC TGG AAG CTC CTT CGA -3'
iNOS	Sentido: 5'- GCA GCT GGG CTG TAC AAA -3'
	Antisentido: 5'- AGC GTT TCG GGA TCT GAA T -3'
LXRα	Sentido: 5'- CAA CAG TGT AAC AGG CGC T-3'
	Anti-sentido: 5'- TGC AAT GGG CCA AGG C-3'
LXRβ	Sentido: 5'- CCC CAC AAG TTC TCT GGA CAC T-3'
	Anti-sentido: 5'- TGA CGT GGC GGA GGT ACT G-3'
SREBP1c	Sentido: 5'- TGG ATC TGT ACA CTT TAC ACA GTT CCA-3'
	Anti-sentido: 5'- CCC GGT TTT CTG AAA ACT CAA A -3'
36B4	Sentido: 5'- GGC CCT GCA CTC TCG CTT TC -3'
	Anti-sentido: 5'- TGC CAG GAC GCG CTT GT -3'

6.3. Estudio de perfil transcripcional por análisis de microarrays

Para estudiar la regulación transcripcional mediada por LXR en células dendríticas de ratón se emplearon microarrays de ADN. Se realizaron tres experimentos independientes, y en cada uno se procedió del siguiente modo: se aislaron los progenitores de la médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} y se hizo un *pool* de cada genotipo. Cada *pool* se distribuyó en tres placas, y las células se diferenciaron hacia células dendríticas con la citoquina GM-CSF. Se evaluó el efecto transcripcional que conlleva la ausencia de LXR en las células dendríticas, y para ello se analizó el ARN de células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, inmaduras y maduras (LPS 500 ng/ml, 24 horas). También, se analizó el efecto de la activación de LXR, por lo que células dendríticas WT maduras fueron estimuladas con los ligandos sintéticos GW3965, 1 μ M, o vehículo (control), en los días 5 y 7 de diferenciación. Finalizado el tiempo de tratamiento, las células se lisaron con TRIZOL[®] (Invitrogen), y el ARN total se purificó usando columnas *RNeasy* (Qiagen). El perfil transcripcional se diseñó con los microarrays de ratón *Affymetrix 430 2.0*. Los datos se analizaron con el programa *GeneSpring and GeneChip Analysis Suite* (Affymetrix), descrito previamente (Zelcer et al., 2007). Sólo se han representado las diferencias de expresión estadísticamente significativas.

7. Estudio del tráfico de las células dendríticas

7.1. Análisis de la capacidad migratoria

7.1.1. Ensayo “FITC skin painting”: sensibilización *in vivo* de la piel

Para estudiar la capacidad migratoria de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} en comparación con las células dendríticas WT, se sensibilizó la piel de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} con la solución FITC (0.5%) (Sigma, St Louis, MO), disuelto en acetona:dibutilftalato 1:1 (vol:vol) (Robbiani et al., 2000); Thomas et al., 1980). La solución (50-100 μ l de la mezcla) se aplicó en la piel del lomo de los ratones, previamente afeitada, y los animales se sacrificaron transcurridas 24-48 horas después, procediéndose seguidamente a la extracción de los ganglios linfáticos drenantes (ganglios linfáticos inguinales). Los ganglios se procesaron como se explicó anteriormente en el apartado 3 de Histología, y se realizaron las correspondientes tinciones inmunorreactivas con diferentes anticuerpos acoplados a fluorocromos, con el fin de delimitar las poblaciones celulares de los ganglios y la presencia de células dendríticas.

7.1.2. Ensayo de migración *in vivo*

Con el fin de comparar la capacidad migratoria de las células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} *in vivo*, se marcaron con marcadores fluorescentes células dendríticas maduras derivadas *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea procedentes de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, y se inyectaron subcutáneamente en varios ratones WT. Posteriormente, transcurridas 24 horas, se extrajeron los ganglios linfáticos drenantes, y se analizó mediante inmunofluorescencia la presencia en los mismos de células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} marcadas con las sustancias fluorescentes. Para ello, 10⁶ células dendríticas maduras LXR WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} se marcaron con CMFDA (CellTracker™ Green CMFDA (5-clorometilfluoresceína diacetato)), y CMTPIX (CellTracker™ Red CMTPIX) (*Molecular Probes*, Invitrogen), durante 30 minutos a 37°C. Estos colorantes reaccionan con

las esterasas citoplasmáticas de las células viables en cultivo, provocando que la célula permanezca teñida de color verde o rojo fluorescente, respectivamente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS. Una mezcla de 10^6 células dendríticas teñidas, formada por células de ambos genotipos, se inyectó en un volumen de 50 μ l en la almohadilla plantar de ratones WT. Transcurridas 24-48 horas, los ganglios linfáticos poplíteos y braquiales (empleados como control) fueron recolectados y congelados como se describió en el apartado 3 de histología, para la posterior observación de las células dendríticas migradas mediante tinción inmunorreactiva de los ganglios linfáticos. También se realizaron experimentos similares alternando ambos colorantes fluorescentes.

7.2. Ensayos de quimiotaxis *in vitro*

Los ensayos de quimiotaxis se emplearon para analizar la capacidad de migración de las células dendríticas hacia una sustancia quimioatrayente. La migración de las células dendríticas está regulada por receptores quimiotácticos y sus correspondientes ligandos (Banchereau and Steinman, 1998). Para medir esta capacidad migratoria de las células dendríticas se realizaron ensayos de quimiotaxis empleando un gradiente de las citoquinas CXCL12, CCL19 y CCL21. La determinación de la quimiotaxis en respuesta a quimioquinas se realizó midiendo el número de células que migraron a través de un filtro de policarbonato (tamaño del poro de 5- μ m) en una cámara *Transwell* de 24 pocillos (*Transwell® Permeable Supports*, Costar® Europe, Corning) (figura M2).

Mediante esta técnica se analizó la capacidad quimiotáctica de células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$, maduras e inmaduras, frente a diferentes quimioquinas recombinantes (CXCL12, CCL19, CCL21, PeproTech), y a diferentes

concentraciones (10, 100, 200, 1000 ng/ml). Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado. Las quimioquinas se diluyeron en medio RPMI 1640 al 0.5% de FBS en un volumen final de 600 μ l a la adecuada concentración (100 ng/ml en la mayoría de los experimentos). Los insertos de cultivo del *Transwell* se introdujeron en cada pocillo, y las células ($3.5\text{-}5 \times 10^5$ células en cada pocillo) se añadieron en la cámara superior, resuspendidas en medio en un volumen final de 100 μ l. Después de incubar los platos durante 3 horas a 37°C al 5% CO₂, las células de la cámara inferior fueron recuperadas y se contabilizaron. Para medir de forma selectiva la respuesta quimiotáctica, empleamos el índice quimiotáctico, que se define como el número de veces que se incrementa dicha quimiotaxis sobre el nivel basal (en ausencia de quimioquinas). Para los ensayos de inhibición de cADPR, las células se incubaron previamente con el inhibidor 8-Br-cADPR (100 μ M, Sigma) durante 30 minutos, y posteriormente se procedió a la realización del ensayo quimiotáctico como acaba de describirse.

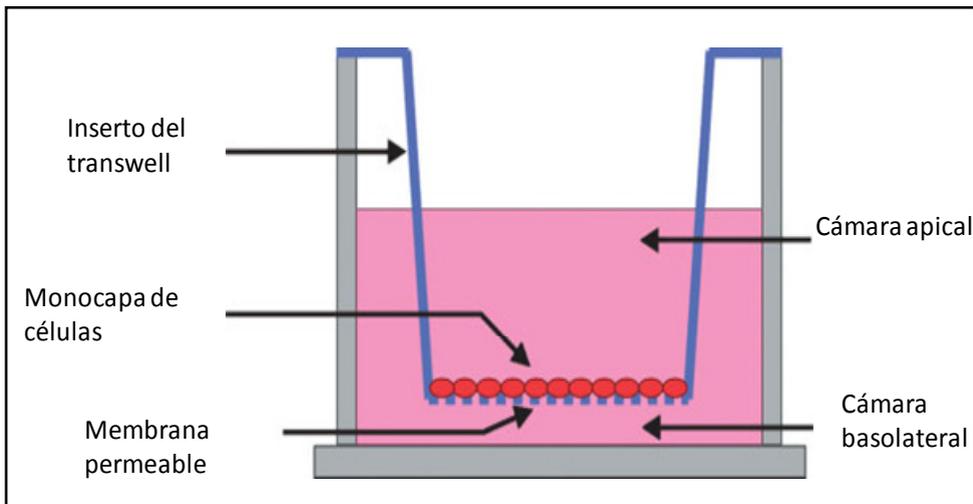


Figura M2.- Esquema de un *transwell* con inserto donde se muestra la separación de las cámaras apical y basolateral por una membrana permeable donde confluye una monocapa de células en la superficie apical.

8. Análisis estadístico

Los valores presentados son la media \pm el error estándar de la media de los resultados obtenidos en ensayos valorados por triplicado, de un número variable de experimentos que se especifica en cada caso. Las comparaciones se efectuaron mediante el test de la t de Student no pareado (Excel, Microsoft). Para múltiples comparaciones, los datos fueron evaluados por análisis de una vía de varianza (ANOVA). Cuando se indica que los resultados son estadísticamente significativos, el nivel de significación se tomó como $p < 0.05$ o $p < 0.01$, como se indica en cada caso.

RESULTADOS

1. Caracterización de la actividad de los receptores LXR en células dendríticas

1.1. Análisis del proceso de diferenciación y maduración de las células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ -/-

Como primera aproximación al estudio del papel de los receptores LXR en la biología de las células dendríticas, comparamos el proceso de diferenciación y maduración de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/- y WT. En el pasado, una gran limitación para el estudio de la biología del sistema de estas células era la dificultad para aislar cantidad suficiente de células procedentes de tejidos y de órganos linfoides con una pureza adecuada. En 1993, Inaba y colaboradores publicaron un protocolo para la generación de células dendríticas, a partir del cultivo de progenitores de médula ósea en presencia de las citoquinas GM-CSF e IL-4 (Inaba et al., 1993). Años más tarde, se publicó una versión revisada de dicho protocolo (Lutz et al., 1999), con el que se incrementó considerablemente la pureza de las células dendríticas obtenidas a partir de progenitores de médula ósea. Este protocolo, como ya se comentó en el apartado 2.1.1. de Material y métodos, se basa en el cultivo a baja densidad de células totales de médula ósea sin seleccionar durante 7-9 días, en presencia de GM-CSF como único factor de diferenciación.

Por esta razón, como primer objetivo del presente trabajo nos planteamos la generación de células dendríticas a partir de progenitores de médula ósea procedentes de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/-, adaptando nuestro protocolo a partir del método estándar descrito anteriormente (Lutz et al., 1999). Así, generalmente partimos de $4-7 \times 10^7$ células de médula ósea procedente de los fémures y tibias

de ratones de 6 a 8 semanas de edad WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Estas células se cultivaron durante 7 días en medio RPMI1640 suplementado con la citoquina GM-CSF (200 U/ml), necesaria para una correcta diferenciación. La activación de las células dendríticas se realizó tratando los cultivos con LPS (500 ng/ml) durante 24 horas, tras la diferenciación.

La observación de los cultivos de células dendríticas al microscopio de luz convencional reveló un desarrollo de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ similar al de las células dendríticas procedentes de ratones WT, como se puede apreciar en la figura 1A, donde se representan fotografías de contraste de fase de cultivos de células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ en los días 5 (inmaduras) y 8 (maduras) de cultivo. Las células dendríticas inmaduras presentaron pequeñas proyecciones citoplasmáticas y núcleo excéntrico. Cuando estas células se estimularon con LPS durante 24 horas, estas proyecciones citoplasmáticas fueron mucho mayores y los núcleos excéntricos aparecen mellados, además de producirse un aumento de tamaño y heterogeneidad celular. Estas características se apreciaron en los cultivos de células de ambos genotipos, por lo que no se observaron diferencias significativas en la morfología de las células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ respecto de ratones WT.

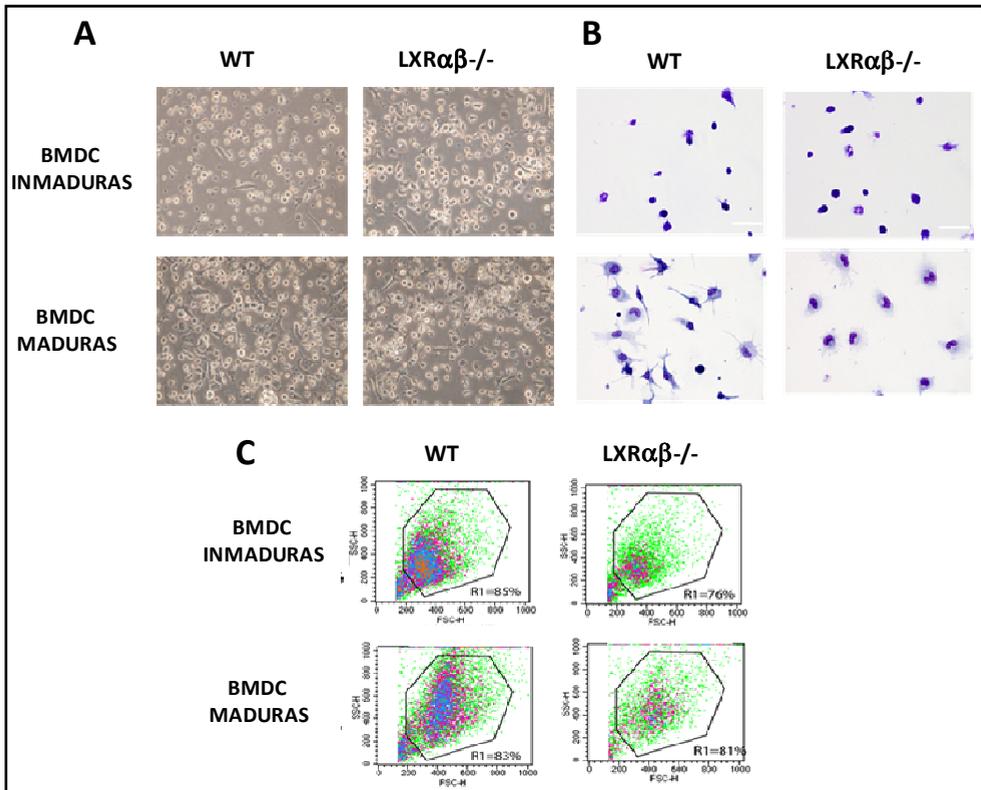


Figura 1.- Análisis de las características de las células dendríticas inmaduras y maduras LXRαβ^{-/-} y WT cultivadas *in vitro*. Células dendríticas diferenciadas a partir de progenitores de médula ósea de ratones WT y LXRαβ^{-/-} en presencia de la citoquina GM-CSF durante 7 días, se maduraron posteriormente con LPS durante 24 horas. Las fotografías de contraste se tomaron directamente de las placas de cultivo en el día 5 (BMDC inmaduras) y 8 (BMDC maduras) de diferenciación, en el microscopio de luz convencional. Aumento original de 40x (A). Las células se tiñeron con un kit de tinción rápida para hematología. Fotografías de contraste de fase, aumento 60x (B). Análisis de los parámetros FSC y SSC mediante citometría de flujo (C).

Mediante tinción Panóptico rápido de las células, el análisis de la morfología de las células dendríticas derivadas de médula ósea inmaduras y maduras WT y LXRαβ^{-/-} a mayor aumento (60x) no reveló diferencias significativas entre ambos genotipos (figura 1B). Las células inmaduras presentaron mayor irregularidad y menor tamaño que las células maduras en presencia de LPS, que

exhibieron en su citoplasma largas proyecciones. El análisis por citometría de flujo de los parámetros de dispersión FSC (tamaño, *forward scatter*) y SSC (complejidad, *side scatter*) de ambas poblaciones celulares (figura 1C), corroboró que las células dendríticas presentan baja complejidad interna (SSC) y variado tamaño celular (FSC) en el día 5 de diferenciación (BMDC inmaduras), incrementando dicho grado de complejidad y tamaño celular tras la maduración (BMDC maduras). Estas diferencias de tamaño y granularidad. debidas al estado de diferenciación se apreciaron en las células de ambos genotipos, sin que se observaran variaciones morfológicas relevantes entre las células dendríticas WT y las células LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. De este modo, la ausencia de LXR no parece modificar las características morfológicas de las células dendríticas inmaduras y maduras.

Tras recibir el adecuado estímulo (ligandos de TLR, citoquinas inflamatorias, ligandos de linfocitos T, etc.), las células dendríticas sufren una reorganización dramática de la forma y función celular, fenómeno conocido como “maduración”. La maduración de las células dendríticas tras el encuentro con productos microbianos se traduce, entre otros fenómenos, en un notable aumento en la expresión de moléculas de MHC-II en su membrana. Así, el aumento de expresión de las moléculas de superficie MHC-II constituye un parámetro importante de la correcta maduración de las células dendríticas. Como se aprecia en la figura 2A, mediante tinción inmunocitoquímica se distinguieron pequeñas células inmaduras, que expresan niveles bajos de MHC-II en superficie (verde), y células maduras de gran tamaño, donde la expresión de superficie de MHC-II es más generalizada. Los niveles de expresión de MHC-II son similares en ambos genotipos.

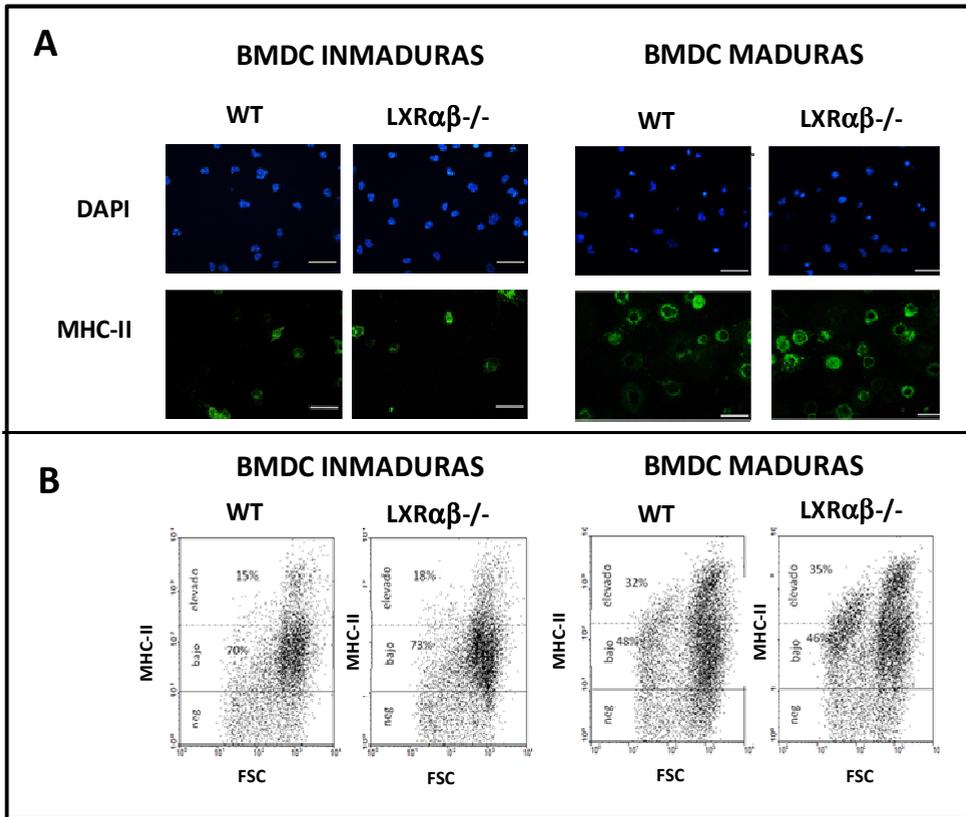


Figura 2.- Análisis de la expresión en superficie de moléculas de MHC-II en células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ -/-. (A) Tinción inmunocitoquímica de MHC-II (verde) en células dendríticas inmaduras y maduras obtenidas a partir de progenitores procedentes de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/. Imágenes tomadas mediante microscopía de fluorescencia, aumento de 60x. (B) Análisis de la relación entre el parámetro de dispersión FSC y la expresión de moléculas de MHC-II. Las células dendríticas se tiñeron con el anticuerpo frente a moléculas de MHC-II, y las poblaciones resultantes se cuantificaron mediante citometría de flujo.

Además, el análisis mediante citometría de flujo de la expresión en superficie de moléculas de MHC-II reveló un proceso de desarrollo y maduración similar de las células dendríticas de ambos genotipos (Figura 2B). De este modo, se dividió la población de células dendríticas inmaduras y maduras en base al marcaje de MHC-II con respecto al tamaño celular (FSC), identificándose principalmente

tres grupos celulares: un primer grupo de células con expresión casi inexistente de moléculas de MHC-II; un segundo grupo con baja expresión de moléculas de MHC-II; y un tercer grupo con elevada expresión de moléculas de MHC-II. La mayoría de las células dendríticas inmaduras WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ expresaron niveles bajos de MHC-II en su superficie mientras que, tras la maduración, se produjo un incremento notable de la población celular que expresa altos niveles de moléculas de MHC-II, coincidiendo a su vez con un aumento de tamaño de dichas células (FSC). Este análisis permite afirmar que no se observan diferencias significativas en la expresión de moléculas de MHC-II entre ambos genotipos.

1.2. Caracterización fenotípica de células dendríticas WT Y $LXR\alpha\beta^{-/-}$

La defensa del organismo requiere la acción conjunta de la inmunidad innata no antígeno-específica y de la inmunidad adaptativa antígeno-específica (Fearon et al., 1996; Hoffmann et al., 1999). Las características clave del sistema inmune innato incluyen la capacidad para el reconocimiento rápido de patógenos y/o daño en los tejidos, y la capacidad para señalar la presencia de dicho daño a las células del sistema inmune adaptativo. Este potente y sofisticado sistema necesita ser instruido y regulado por APC. Las células dendríticas constituyen APC exclusivos, ya que son únicas en su capacidad para inducir la respuesta inmune primaria, así como para el establecimiento de la memoria inmunológica (Banchereau and Steinman, 1998; Bell et al., 1999; Steinman, 1991).

Como se ha descrito en la Introducción de este trabajo, los progenitores de las células dendríticas en la médula ósea dan lugar a los precursores circulantes que se dirigen hacia los tejidos, donde residen como células inmaduras con alta

capacidad fagocítica. Tras el daño tisular, las células dendríticas inmaduras capturan antígenos y posteriormente migran hacia los órganos linfoides, donde seleccionan linfocitos T antígeno-específicos, iniciando así la respuesta inmune. Las células dendríticas presentan los antígenos a los linfocitos T colaboradores CD4⁺, que a su vez regulan a los efectores inmunes, incluyendo los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y los linfocitos B, así como macrófagos no antígeno-específicos, eosinófilos, y células NK (Lambrecht et al., 1998). Además, las células dendríticas instruyen a las células efectoras para dirigirse hacia los sitios de daño tisular. De este modo, las células dendríticas constituyen un complejo sistema de células que, bajo diferentes condiciones microambientales, puede inducir estados como inmunidad o tolerancia.

El epítipo CD11c (familia de las integrinas αX) al que se une el anticuerpo N418 (Metlay et al., 1990) se expresa abundantemente en células dendríticas de ratón, además de en otros tipos celulares, como macrófagos cultivados (Geissmann et al., 2010a). En este trabajo hemos empleado CD11c como marcador de superficie de células dendríticas. Con el fin de comprobar la correcta diferenciación de los progenitores procedentes de médula ósea hacia células dendríticas con la citoquina GM-CSF, analizamos la expresión de CD11c mediante citometría de flujo. Como se aprecia en la figura 3A, la mayoría de las células inmaduras y maduras WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} se mostraron como células CD11c⁺ tras 7 días de diferenciación, y la expresión de moléculas de MHC-II se incrementó después de la maduración de las células, como anteriormente habíamos descrito.

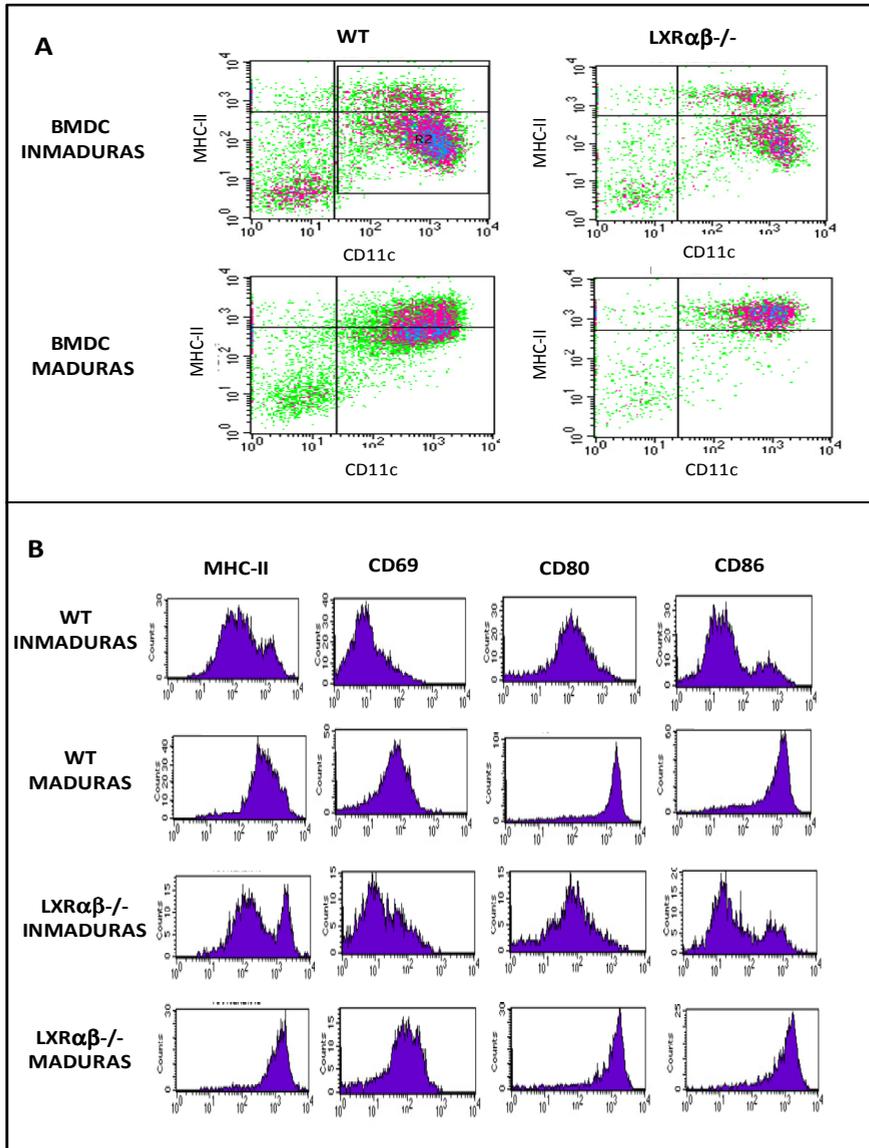


Figura 3.- Descripción del fenotipo antigénico de las células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} derivadas de progenitores de médula ósea. Se analizó la expresión de MHC-II y CD11c en células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} diferenciadas *in vitro* con GM-CSF y posteriormente estimuladas durante 24 horas con LPS (A). Se analizó la expresión de distintos marcadores de superficie de las células en suspensión (B). Análisis realizados mediante citometría de flujo.

Como parte importante de la caracterización de las células dendríticas derivadas de progenitores procedentes de médula ósea WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$, estudiamos el fenotipo de las células dendríticas inmaduras y maduras mediante el análisis de distintas moléculas de superficie, empleadas como marcadores de maduración. La expresión de moléculas de MHC-II, de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, así como del marcador de activación CD69, en células dendríticas inmaduras de ambos genotipos fue similar (figura 3B). Tras la maduración de las células se incrementó la expresión de estos marcadores en ambos genotipos, adquiriendo el fenotipo acorde con las propiedades estimuladoras de la presentación antigénica. Este análisis permite afirmar que el estado de diferenciación y maduración de las células dendríticas derivadas de progenitores procedentes de médula ósea $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT es muy similar, adquiriendo perfiles fenotípicos prácticamente idénticos. Por tanto, éste y los anteriores experimentos indican que la ausencia de LXR no afecta de manera importante a la diferenciación y maduración de las células dendríticas.

2. Caracterización de los receptores nucleares LXR en células dendríticas

Se encuentra ampliamente descrito que los receptores nucleares LXR están involucrados en la regulación del metabolismo del colesterol (Zelcer and Tontonoz, 2006). Además de su papel clave en la homeostasis del colesterol, LXR ha sido descrito como regulador clave de la expresión de genes inflamatorios y de la inmunidad innata (Castrillo et al., 2003b; Joseph et al., 2004; Valledor et al., 2004). Estudios recientes han revelado conexiones inesperadas entre el metabolismo lipídico, LXR y la respuesta inmune adaptativa, destacando en este punto la aportación de nuestro grupo de investigación al describir un defecto en la

fagocitosis de células apoptóticas en ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ (Alonso-González et al; 2009). Sin embargo, el papel de la actividad de los receptores LXR en la biología de las células dendríticas no se conoce. Por ello, uno de los principales objetivos del trabajo realizado fue estudiar el nivel de expresión de las isoformas α y β de LXR en células dendríticas de ratón, así como profundizar en la regulación transcripcional de los principales genes diana de LXR en las células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$.

2.1. Estudio de la expresión de las isoformas $LXR\alpha$ y $LXR\beta$ en células dendríticas

Con el objetivo de estudiar la expresión de los receptores LXR, a nivel basal y tras el tratamiento con los agonistas sintéticos de LXR, se analizó la expresión de $LXR\alpha$ y $LXR\beta$ en células dendríticas WT. Para ello, se diferenciaron células dendríticas a partir de progenitores de médula ósea WT en presencia de la citoquina GM-CSF (200 U/ml), y se sometieron a maduración con LPS (500 ng/ml) durante 24 horas. La activación máxima de los receptores nucleares LXR y RXR se indujo mediante el tratamiento de las células dendríticas con los ligandos sintéticos de LXR (GW3965, 1 μ M) y RXR (LG268, 100 nM), en los días 5 y 7 de diferenciación. Es importante indicar que, al no existir anticuerpos suficientemente específicos que reconozcan las isoformas de LXR de ratón, se analizó la expresión de ambas isoformas mediante análisis de ARN por qPCR. Como se aprecia en la figura 4, la expresión de la isoforma $LXR\alpha$ se incrementó durante el proceso de maduración de las células dendríticas, de manera análoga a lo que sucede en el proceso de activación de macrófagos derivados de médula ósea (Barish et al., 2005). Por el contrario, la expresión de la $LXR\beta$ no varió durante el proceso de maduración de las células dendríticas (figura 4). La activación del heterodímero

LXR/RXR con ligandos sintéticos no promueve cambios significativos en la expresión de los receptores LXR en células dendríticas inmaduras (iDC) y maduras (mDC).

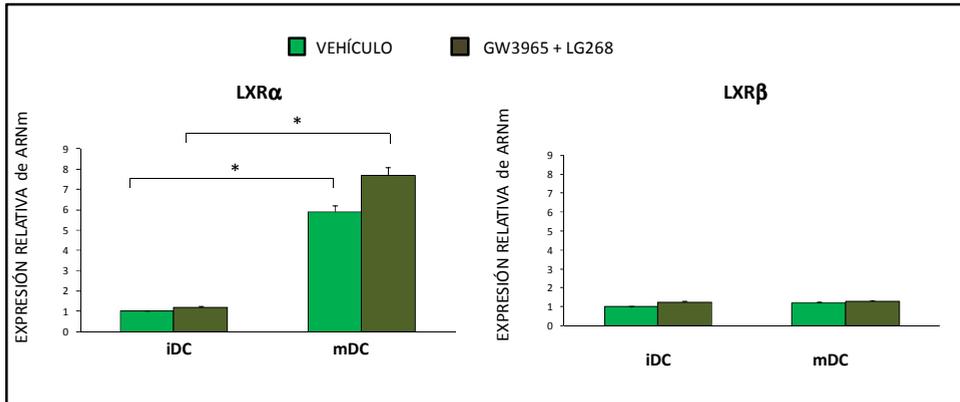


Figura 4.- Análisis de la expresión de las isoformas de los receptores LXR en las células dendríticas. Cuantificación mediante qPCR de los niveles de expresión relativos de las isoformas LXR α y LXR β en células dendríticas diferenciadas a partir de progenitores de médula ósea de ratones WT en presencia de la citoquina GM-CSF (iDC, células dendríticas inmaduras), y activadas con LPS durante 24 horas (mDC, células dendríticas maduras). Las células se trataron con los agonistas sintéticos de LXR y RXR, GW3965, 1 μ M, y LG268, 100 nM, respectivamente, en los días 5 y 7 de diferenciación. Los niveles están normalizados con la expresión de 36B4. *: $p < 0,05$, diferencia respecto a la muestra control (vehículo).

2.2. Estudio de la actividad transcripcional de LXR en células dendríticas

Estudios anteriores llevados a cabo en macrófagos primarios de ratón describen la implicación de los receptores LXR en la regulación de la expresión de genes inflamatorios y del metabolismo lipídico (Castrillo et al., 2003a; Joseph et al., 2003). Sin embargo, el papel transcripcional de los receptores LXR en las células dendríticas no se ha analizado en detalle. Por ello, y con el objetivo de dilucidar si

los receptores LXR están activos transcripcionalmente en las células dendríticas, estudiamos el nivel de expresión de conocidos genes diana de LXR en células dendríticas WT estimuladas con los ligandos sintéticos anteriormente citados, en ambos estadios de diferenciación.

ABCA1 y SREBP1c son genes con un importante papel en el transporte reverso de colesterol y en la síntesis de ácidos grasos, respectivamente, y cuya expresión está regulada de manera directa por LXR en todos los tejidos estudiados hasta el momento (Repa et al., 2000a; Venkateswaran et al., 2000a). El análisis del ARN de células dendríticas WT por qPCR demostró que la activación del heterodímero LXR/RXR por los agonistas sintéticos se tradujo en un incremento de la expresión de ABCA1 (figura 5). Además, este aumento fue significativamente mayor tras la maduración de las células con el ligando de TLR4, LPS (mDC).

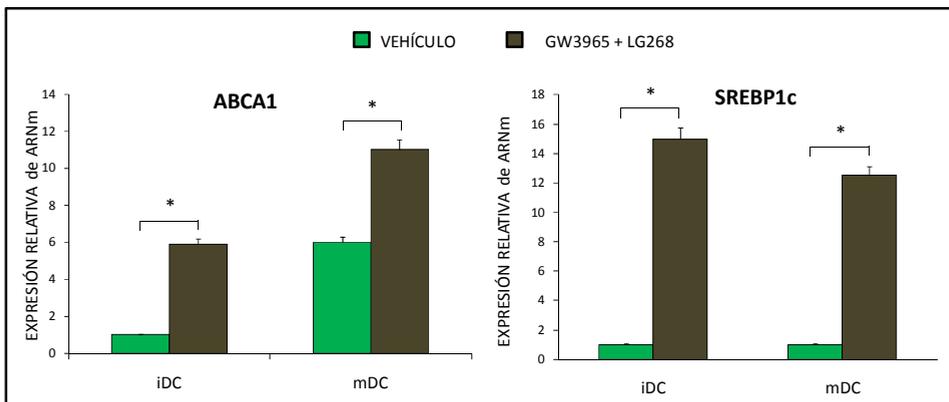


Figura 5.- Análisis de la expresión de genes diana de LXR en células dendríticas. Se analizó la expresión mediante qPCR de ABCA1 y SREBP1c en células dendríticas diferenciadas con GM-CSF a partir de progenitores de médula ósea de ratones WT, estimuladas con los agonistas de LXR (GW3965, 1 μ M) y RXR (LG268, 100 nM), inmaduras (iDC) y maduras (mDC). Los niveles están normalizados con el gen 36B4. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos. *: $p < 0,05$, diferencia respecto a la muestra control (vehículo) en cada caso.

Del mismo modo, la expresión de SREBP1c también se incrementó tras la activación de LXR, de forma similar en células dendríticas maduras (mDC) e inmaduras (iDC). Este análisis revela que las células dendríticas responden a los agonistas sintéticos de LXR de igual modo que otros tipos celulares, como macrófagos (Castrillo and Tontonoz, 2004; Tontonoz and Mangelsdorf, 2003), con inducción de la expresión de genes encargados de regular el metabolismo lipídico.

Para corroborar que la actividad transcripcional inducida por los ligandos sintéticos de LXR/RXR es efectivamente dependiente de los receptores LXR, se comparó la expresión de genes diana de LXR entre células dendríticas maduras e inmaduras WT y LXR $\alpha\beta$ -/. Se analizó la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, así como la expresión de iNOS, implicado en la inflamación, mediante análisis por qPCR de ARN obtenido de células dendríticas. Este análisis reveló que la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, como los transportadores de colesterol de la familia ABC, ABCA1 y ABCG1 (Kennedy et al., 2001), y SREBP1c, es menor en células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/ respecto a células WT, tanto en células inmaduras (iBMDC) como en maduras (mBMDC) (figura 6). La maduración de las células dendríticas WT disminuyó sensiblemente la expresión de estos genes, excepto en el caso de ABCA1, cuya expresión se incrementó tras la maduración, hecho probablemente debido a una regulación específica de ABCA1 en respuesta a la señalización inflamatoria (Gerbod-Giannone et al., 2006). El análisis de la expresión de genes inflamatorios reveló que la maduración de las células dendríticas incrementa la expresión de iNOS, de manera muy significativa en las células LXR $\alpha\beta$ -/, consistente con el papel anti-inflamatorio de LXR descrito anteriormente y que probablemente se encuentre también activo en las células dendríticas.

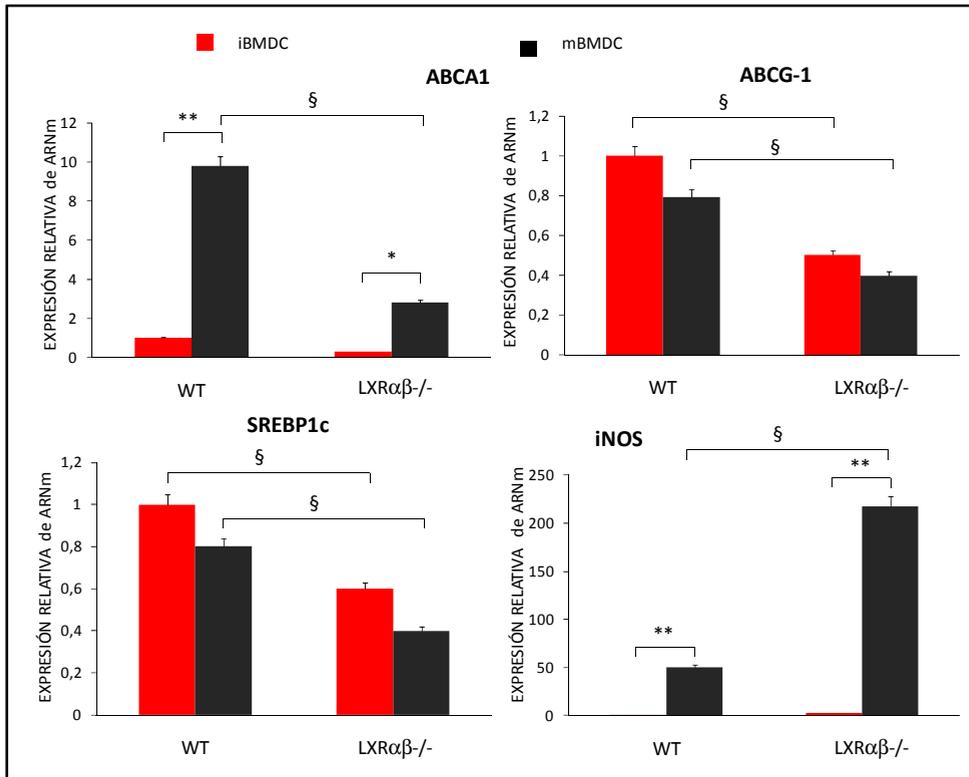


Figura 6.- Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo del colesterol y la inflamación en células dendríticas WT y LXRαβ-/-. Mediante qPCR se analizó la expresión de ABCA1, ABCG-1, SREBP1c e iNOS en células dendríticas diferenciadas a partir de progenitores de médula ósea de ratones WT y LXRαβ-/- en presencia de la citoquina GM-CSF, inmaduras (iBMDC) y maduras (mBMDC). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, diferencia respecto a iBMDC en cada genotipo. §: $p < 0,05$, diferencia respecto a WT (iBMDC, mBMDC).

3. Análisis de las poblaciones celulares de los órganos linfoides secundarios de ratones WT y LXRαβ-/-

Como parte del estudio de caracterización de las células dendríticas LXRαβ-/- hemos analizado tanto la morfología celular como el proceso de

diferenciación y activación *in vitro* de las mismas, comprobando que las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ no presentan características diferentes, en los parámetros analizados, a las células dendríticas WT. Así pues, se procedió al análisis de la distribución tisular de las células dendríticas y de otros tipos celulares del sistema inmune, residentes en los órganos linfoides secundarios. Para ello, se analizó la composición celular del bazo y los ganglios linfáticos poplíteos (también se analizaron ganglios linfáticos inguinales, braquiales, submandibulares, datos no mostrados) de ratones de edad comprendida entre 6 y 8 semanas, $LXR\alpha\beta^{-/-}$ en comparación con WT. Se emplearon anticuerpos selectivos de las principales poblaciones celulares de estos órganos: CD11c para marcar células dendríticas, F4/80 para macrófagos de la pulpa esplénica roja, B-220 para linfocitos B, CD4 y CD8 para linfocitos T, Madcam-1 para las células epiteliales del seno marginal, y sialoadhesina para macrófagos del seno subcapsular y medular de los ganglios linfáticos (van den Berg et al., 1992). Se realizaron distintas combinaciones de estos anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos para co-localizar las poblaciones celulares.

El análisis mediante inmunofluorescencia de criosecciones reveló que el bazo de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ presenta una composición y localización de las principales poblaciones de linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas y macrófagos de pulpa roja muy similares al bazo de ratones WT (figura 7A). Asimismo, las imágenes obtenidas del ganglio linfático poplíteo mostraron gran similitud en la disposición de linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas y macrófagos del seno subcapsular y medular (figura 7B). Mediante este análisis concluimos que no se aprecian diferencias relevantes en la distribución de las principales células del sistema

inmune en bazo y ganglios linfáticos de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ con respecto a ratones WT.

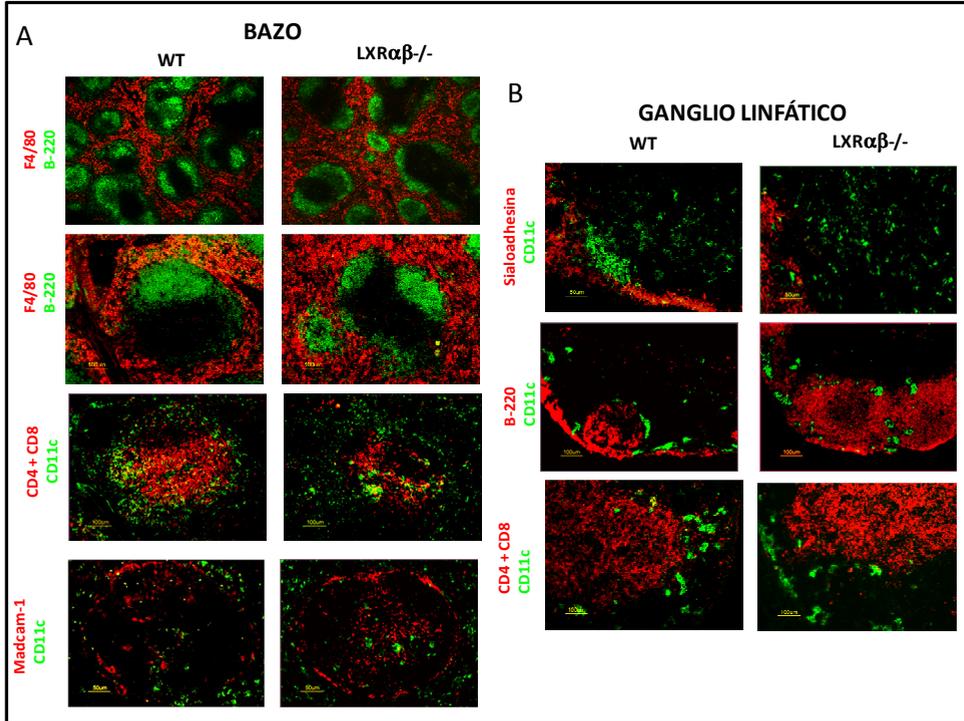


Figura 7.- Estudio de las poblaciones celulares de los órganos linfoides secundarios de ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Análisis mediante inmunofluorescencia de criosecciones de bazo (A) y ganglio linfático poplíteo (B) de ratones (6-8 semanas de edad) WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$, con distintos anticuerpos primarios conjugados a fluorocromos: CD11c, B-220, CD4 y CD8, F4/80, MADCAM-1 y sialoadhesina. Imágenes tomadas mediante microscopía de fluorescencia con aumento de 10X y 20X.

De este modo, el análisis de diferentes parámetros celulares en cultivos *in vitro* de células dendríticas derivadas de médula ósea reveló que no existen variaciones significativas en la diferenciación y maduración de las células dendríticas de los genotipos WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$, y tampoco se han apreciado variaciones en la disposición celular en órganos linfoides secundarios en estado

estacionario. Esto permite concluir que las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ son morfológicamente similares a las células WT, por lo que es probable que la ausencia de LXR no afecte, *a priori*, a su desarrollo y localización tisular en ratones.

4. Análisis de la funcionalidad de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$

Las células dendríticas son las principales APC (Banchereau and Steinman, 1998; Bell et al., 1999), por lo que su elevada capacidad para captar antígenos y procesarlos para su posterior presentación a los linfocitos T son características determinantes de su actividad. Tras el reconocimiento y captación del antígeno, las células dendríticas inmaduras reciben señales que promueven su maduración y migración hacia los ganglios linfáticos, donde van a promover la activación y polarización de linfocitos T *naive*, orquestando la respuesta inmune adaptativa (Banchereau and Steinman, 1998). Para dilucidar si la ausencia de LXR tiene efectos sobre la capacidad para captar antígenos, así como en el fenómeno migratorio se analizaron diversos aspectos de la biología de las células dendríticas procedentes de ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$.

4.1. Estudio de captación de antígenos *in vitro* por parte de células dendríticas

En los tejidos periféricos, las células dendríticas actúan como centinelas capacitados con una gran variedad de mecanismos de captura de antígenos, incluyendo la endocitosis mediada por receptores, la pinocitosis y la fagocitosis. En este trabajo, y con el objetivo de determinar si la capacidad endocítica de las células dendríticas se encuentra alterada en ausencia de LXR, se realizaron ensayos de endocitosis, con los que se estudió la capacidad de captación de moléculas de

dextrano por parte de células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT. Los dextransos son polímeros de poli-D-glucosa, electro-neutros, hidrofílicos, que no tienen capacidad para atravesar las membranas biológicas. Estos polímeros son captados por pinocitosis de fase fluida (Berlin and Oliver, 1980), y son reconocidos por distintos receptores de membrana, expresados mayoritariamente en células dendríticas inmaduras (Sallusto et al., 1996).

Para llevar a cabo este ensayo de endocitosis, las células dendríticas inmaduras derivadas de progenitores de médula ósea de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂ con moléculas de dextrano (1 mg/ml) acopladas a Alexa Fluor® 594. Posteriormente, las células se tiñeron con el anticuerpo CD11c-FITC. La observación de las células por microscopía confocal reveló la captación de moléculas de dextrano (rojo), asociado a marcaje fluorescente específico en la membrana celular, correspondiente a CD11c (verde) (figura 8). La proporción de células doble positivas (CD11c⁺ - Alexa Fluor® 594-dextrano⁺) es muy similar entre células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Este mismo experimento se diseñó a 4°C para demostrar que la captación de dextrano por parte de las células dendríticas se encuentra inhibida a bajas temperaturas, de forma que a 4°C el dextrano es internalizado en muy poca proporción. Estos resultados indican que la capacidad para capturar polisacáridos por parte de las células dendríticas no se ve afectada por la ausencia de LXR. En experimentos análogos no mostrados, en los que se emplearon bacterias *E. coli* fluorescentes (GFP-*E. coli*), se observó el mismo fenómeno.

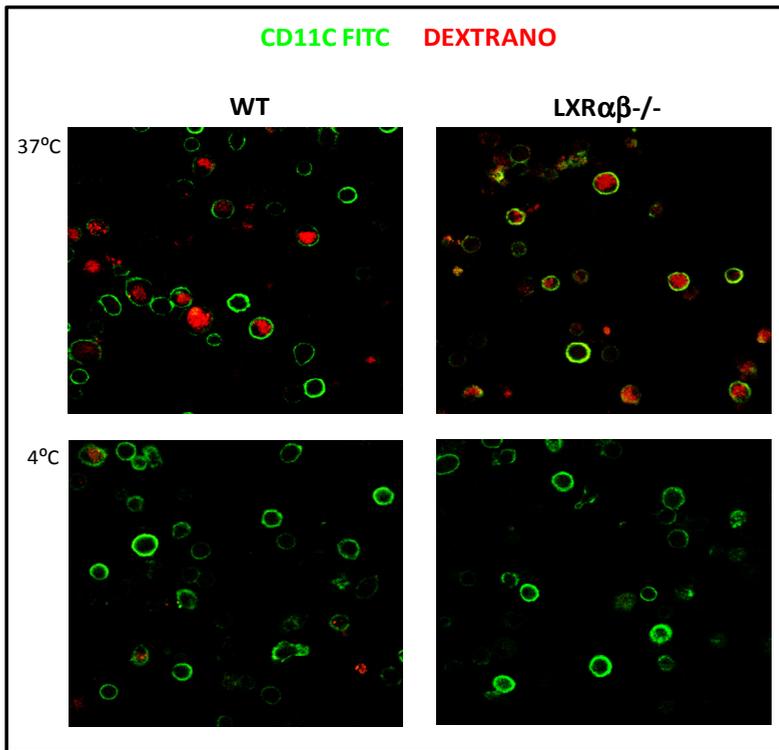


Figura 8.- Análisis de la capacidad endocítica de células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Células dendríticas inmaduras WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ derivadas de médula ósea se incubaron 30 minutos a 37°C y 4°C, con Alexa Fluor® 594 -dextranso (1 mg/ml, rojo), y se tiñeron con el anticuerpo CD11c-FITC (verde). Imágenes tomadas mediante microscopía confocal. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos.

4.2. Análisis de la capacidad migratoria de células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$

Tras la captación del antígeno, las células dendríticas transportan el material antigénico hacia los ganglios linfáticos (Banchereau et al., 2000). Como se comentó anteriormente, esta capacidad para migrar constituye una característica clave de las células dendríticas, y por ello decidimos determinar la posible

influencia de LXR en este fenómeno, empleando modelos establecidos de ensayos de migración, como la sensibilización *in vivo* de la piel de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} y WT, y el estudio de la capacidad quimiotáctica de células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} mediante ensayos de quimiotaxis.

4.2.1. Análisis de la migración *in vivo* de células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}

Para analizar si la actividad endógena de LXR afecta a la migración de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos en respuesta a un estímulo inflamatorio, sensibilizamos la piel de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} mediante la aplicación epicutánea del colorante fluorescente FITC mezclado con el sensibilizador de contacto acetona/dibutilftalato, ensayo conocido como “*FITC skin painting*” (Robbiani et al., 2000); Thomas et al., 1980). Tras la sensibilización de la piel con este agente pro-inflamatorio, las células dendríticas inmaduras captan esta mezcla de FITC y comienzan a madurar y a migrar hacia los ganglios linfáticos drenantes (Macatonia et al., 1987). Transcurridas 18 horas tras la sensibilización del lomo de los ratones, se recogieron los ganglios linfáticos inguinales, y se tiñeron criosecciones de los mismos con anticuerpos anti-B220 (linfocitos B) (figura 9A), anti-CD4 + anti-CD8 (linfocitos T) (figura 9B) y anti-CD11c (células dendríticas) (figura 9C).

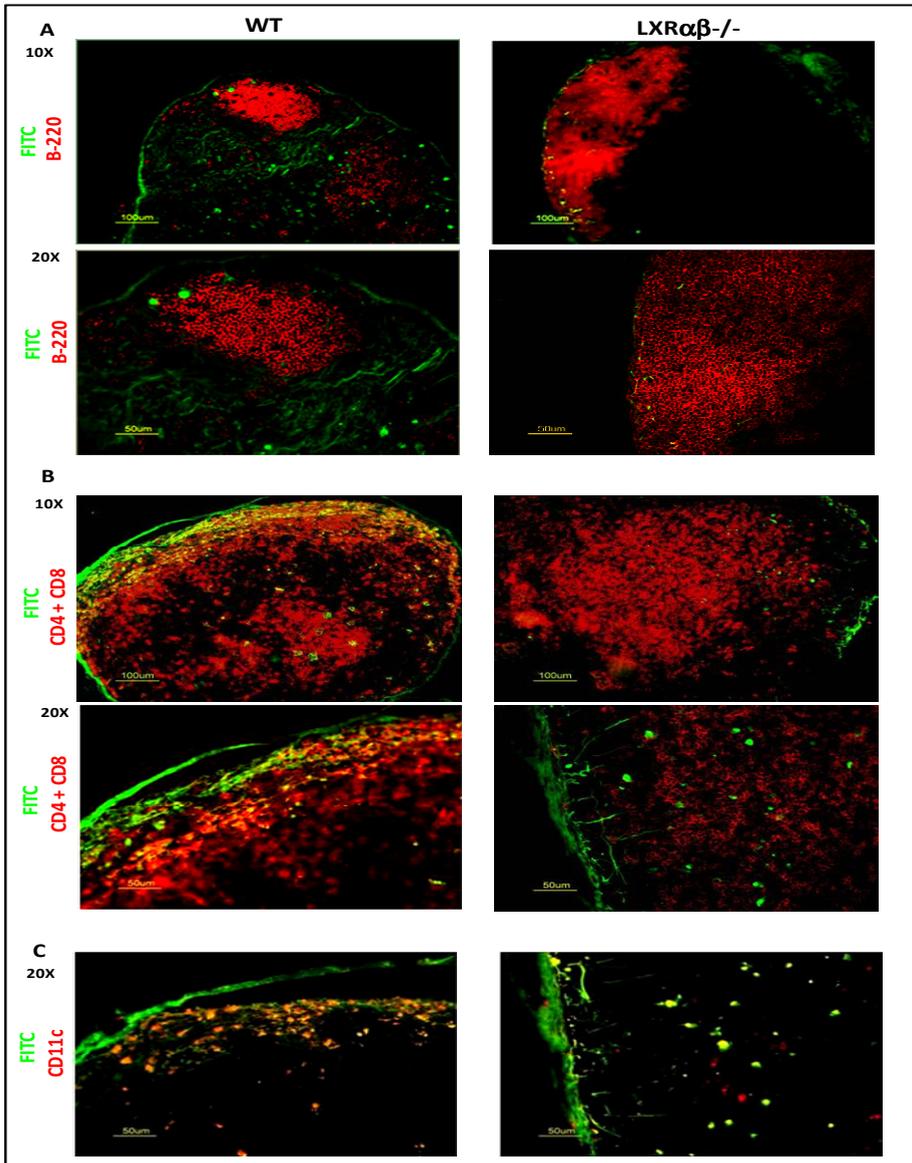


Figura 9.- Análisis de la migración de las células dendríticas tras la sensibilización *in vivo* de la piel con FITC. Criosecciones de ganglios linfáticos inguinales de ratones WT y LXRαβ^{-/-}, cuya piel fue sensibilizada con FITC-acetona/dibutilftalato (verde), fueron teñidas con diferentes combinaciones de anticuerpos (rojo): B220 (A), CD4+CD8 (B), CD11c (C). Las imágenes se obtuvieron en el microscopio de fluorescencia con aumentos de 10x y 20x.

Como se puede observar en la figura 9, las células con fluorescente verde (FITC⁺) fueron fácilmente detectadas en los ganglios linfáticos WT a las 24 horas post-sensibilización, y se localizaron en el área de los linfocitos T (figura 9B). Muchas de estas células FITC⁺ también se muestran co-marcadas con el anticuerpo frente a CD11c (células amarillo/naranja, figura 9C), lo que sugiere que estas células marcadas son células dendríticas que han migrado en respuesta al estímulo antigénico. Por el contrario, pocas células FITC⁺ se observaron en secciones de ganglios linfáticos inguinales de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, incluso en ensayos de sensibilización con una duración de 48 horas (datos no mostrados). El número de células dendríticas FITC⁺- CD11c⁺ detectadas en los ganglios linfáticos de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} sensibilizados con FITC fue significativamente menor comparado con el número de células dendríticas FITC⁺ presentes en los ganglios linfáticos de ratones WT sensibilizados.

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

4.2.2. Defecto en la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}

Tras observar un defecto de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} para migrar eficientemente en respuesta a un estímulo inflamatorio, decidimos analizar si LXR es necesario para la función migratoria en respuesta a estímulos quimiotácticos *in*

vitro. Para estudiar esta posibilidad examinamos la quimiotaxis de células dendríticas derivadas de médula ósea así como de origen periférico, $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT, mediante ensayos de quimiotaxis en *transwell* hacia diferentes gradientes de quimioquinas. Las células capaces de atravesar un filtro fino de policarbonato (tamaño del poro de 5 μm) se recogen de la cámara inferior transcurridas tres horas a 37°C, se fijan y enumeran, y los resultados se expresaron como índice quimiotáctico. De este modo, se cuantificó el número de células migratorias en respuesta a los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21, involucrados en el tráfico de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos (Forster et al., 1999); Gunn et al., 1999). También se realizó este ensayo en respuesta a la quimioquina CXCL12, ligando de CXCR4, que se expresa constitutivamente tanto en tejidos linfoides como en tejidos no linfoides, y que está implicada en el reclutamiento de las células dendríticas en ambos tejidos (Aiuti et al., 1997).

Como aproximación inicial en el estudio de la quimiotaxis de las células dendríticas, analizamos la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas procedentes de progenitores de médula ósea de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT a distintas dosis de quimioquinas, para conocer la concentración idónea en la que el índice quimiotáctico es máximo. Así, realizamos ensayos de quimiotaxis de células dendríticas inmaduras en respuesta a la quimioquina inflamatoria CXCL12 (figura 10A), y de células dendríticas maduras donde se analizó su migración en respuesta a CCL19 (figura 10B) a tres dosis diferentes en ambos casos, 10, 100 y 1000 ng/ml (Penna et al., 2001).

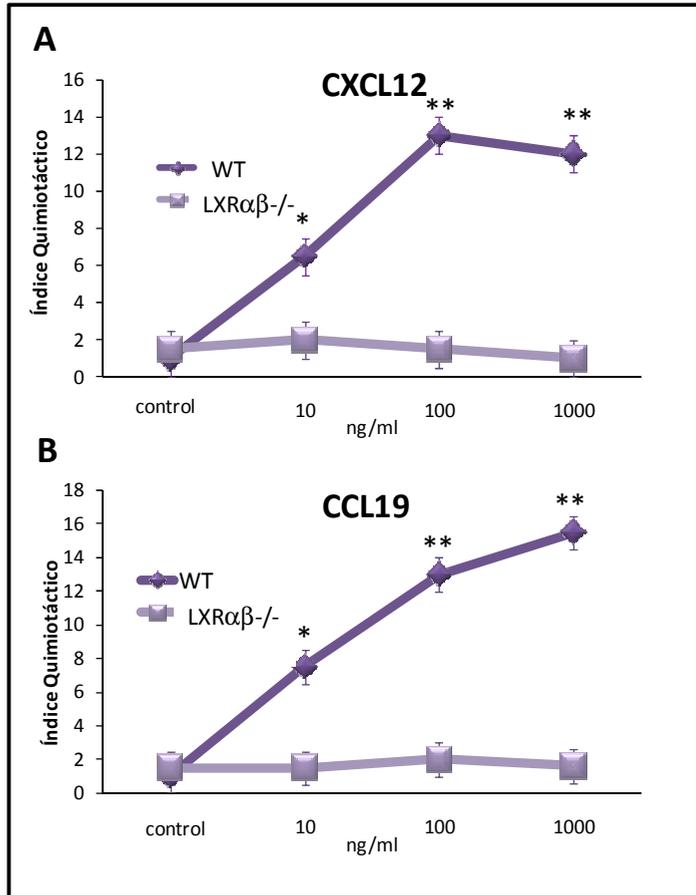


Figura 10.- Análisis de quimiotaxis *in vitro* de las células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} inmaduras (CXCL12, A), y maduras (CCL19, B) se sometieron a ensayos de quimiotaxis con *transwell* a diferentes dosis. Se cuantificaron las células recogidas en la cámara inferior tras tres horas de migración. Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm la desviación estándar del índice quimiotáctico, que se define como el número de veces que se incrementa la quimiotaxis sobre la migración a nivel basal (en ausencia de quimioquinas). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, diferencia respecto a la muestra control en cada genotipo.

Las células dendríticas procedentes de ratones WT, tanto maduras como inmaduras, presentaron una respuesta máxima a las quimioquinas con una concentración de 100 ng/ml. De este modo, se decidió que la dosis oportuna para los futuros ensayos de quimiotaxis fuese de 100 ng/ml. Por el contrario, las células dendríticas procedentes de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ exhibieron una severa reducción de la respuesta quimiotáctica *in vitro*, tanto en células inmaduras frente a CXCL12 como en células maduras en respuesta a CCL19, independientemente de la dosis de quimioquina empleada.

Al corroborar que el defecto migratorio de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ se corresponde con una disminución de la respuesta *in vitro* a quimioquinas, orientamos el estudio quimiotáctico hacia el análisis en respuesta a CCL19, CCL21 y CXCL12, ligandos de CCR7 y CXCR4, respectivamente. Se midió el potencial quimiotáctico de las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT inmaduras y maduras mediante ensayos de quimiotaxis en *transwell* empleando CCL19, CCL21 y CXCL12 como quimioatrayentes, a una dosis de 100 ng/ml (figura 11). Como se esperaba basándonos en resultados previos (Partida-Sanchez et al., 2004), las células dendríticas WT inmaduras presentaron un índice quimiotáctico bajo en respuesta a las quimioquinas CCL19 y CCL21, mientras que respondieron eficientemente a CXCL12 (figura 11A). Sin embargo, las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ inmaduras mostraron una respuesta quimiotáctica significativamente menor en respuesta a las tres quimioquinas empleadas en comparación con las células WT (figura 11A).

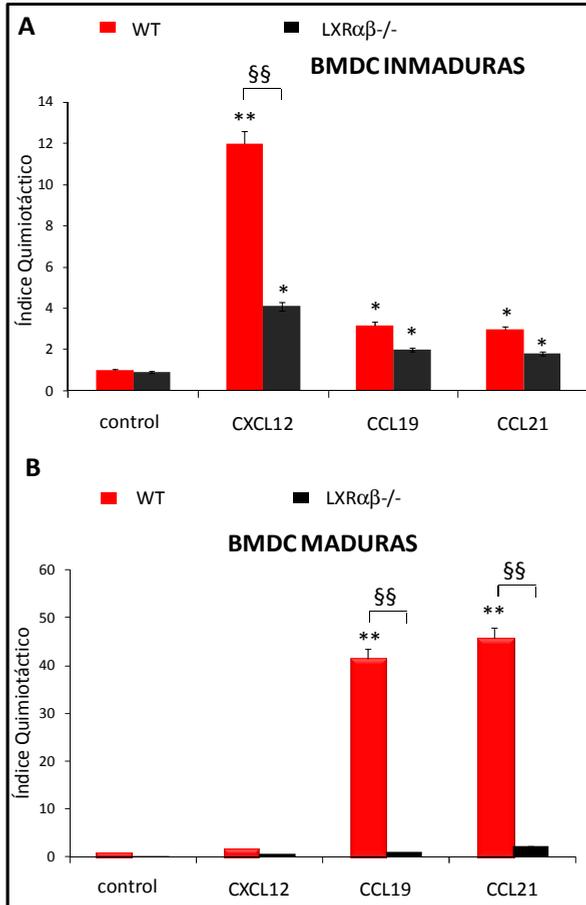


Figura 11.- Reducida capacidad quimiotáctica de las células dendríticas LXRαβ^{-/-}. Se analizó la respuesta quimiotáctica mediante ensayos de quimiotaxis en *transwell* de células dendríticas inmaduras (A) y maduras (B) derivadas de progenitores de médula ósea de ratones LXRαβ^{-/-} y WT, frente a las quimioquinas CCL19, CCL21 y CXCL12 (100 ng/ml). Se cuantificaron las células recogidas en la cámara inferior tras tres horas de migración (triplicados por cada condición experimental). Los resultados se representaron como la media ± la desviación estándar del índice quimiotáctico de tres experimentos independientes. *: p < 0,05, **: p < 0,01, diferencia respecto a la muestra control en cada genotipo. §§: p < 0,01, diferencia respecto a WT.

Resultados similares se encontraron al examinar la migración de las células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ maduras. Las células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ maduras respondieron escasamente a la quimioquina CXCL12 (figura 11B), ya que CXCR4 no se expresa a altas concentraciones en las células dendríticas maduras derivadas de médula ósea. Por el contrario, las células dendríticas WT maduras presentaron un índice quimiotáctico elevado en respuesta a los ligandos de CCR7, CCL21 y CCL19. Sin embargo, la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ maduras a todas la quimioquinas analizadas, se encuentra significativamente reducida. Así, las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ inmaduras y maduras presentaron un defecto importante en la quimiotaxis y no fueron capaces de migrar eficientemente en respuesta a los ligandos de CXCR4 y CCR7.

Estos resultados indican que LXR está implicado en los mecanismos que controlan la migración de las células dendríticas. Si esta implicación es correcta, nosotros postulamos que la activación de LXR por parte de sus agonistas sintéticos podría regular positivamente la migración de las células dendríticas. Para estudiar esta hipótesis experimentalmente, células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ inmaduras y maduras se trataron con el agonista de LXR GW3965 en los días 5 y 7 de diferenciación. Al igual que en los ensayos anteriores, se analizó la capacidad quimiotáctica de las células tras la activación de LXR mediante ensayos de quimiotaxis en *transwell* y posterior análisis del índice quimiotáctico. Así, observamos que el tratamiento de las células dendríticas WT con GW3965 incrementó la capacidad quimiotáctica de las mismas en respuesta a CXCL12 (figura 12A), CCL19 y CCL21 (figura 12B). Por el contrario, las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ presentaron una respuesta quimiotáctica muy baja,

independientemente del estado de activación de las células, sin que el tratamiento con GW3965 generase incremento alguno en el índice quimiotáctico.

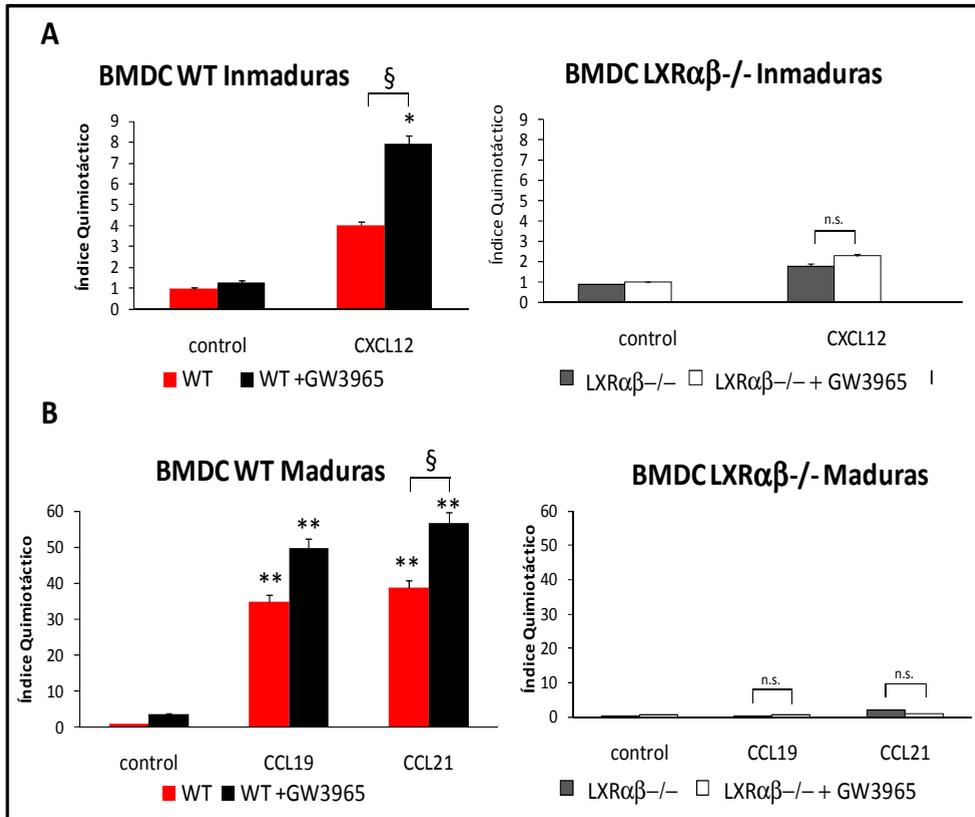


Figura 12.- La activación de LXR produce un aumento del índice quimiotáctico en células dendríticas WT, inmaduras (A) y maduras (B). Se analizó el índice quimiotáctico de células dendríticas diferenciadas a partir de progenitores de médula ósea de ratones LXRαβ-/- y WT. Las células se trataron con GW3965 en los días 5 y 7 de diferenciación, y sometidas a maduración las últimas 24 horas con LPS (500 ng/ml). Posteriormente, se sometieron a quimiotaxis en *transwell* en respuesta a CXCL12, CCL19 y CCL21 (100 ng/ml) durante tres horas, transcurridas las cuales se cuantificó el número de células de la cámara inferior. Los datos se expresaron como la media ± la desviación estándar del índice quimiotáctico. Los resultados obtenidos se extrajeron de al menos 3 experimentos independientes. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, diferencia respecto a WT control. §: $p < 0,05$, diferencia respecto a WT en respuesta a quimioquinas. n.s.: diferencia no significativa.

Posteriormente, se analizó si el defecto quimiotáctico observado era específico de las células dendríticas derivadas de médula ósea, o bien si se reproducía en células dendríticas de diferente procedencia. Para evaluar este fenómeno se emplearon células dendríticas periféricas, concretamente células dendríticas esplénicas. Se analizó la capacidad quimiotáctica hacia los ligandos del receptor de quimioquinas CCR7 de células dendríticas aisladas de bazo a partir de ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$, tratadas con el ligando GW3965 durante 24 horas y posteriormente sometidas a maduración con LPS durante 24 horas más.

Como podemos apreciar en la figura 13, las células dendríticas esplénicas WT presentaron un incremento sustancial de la capacidad quimiotáctica frente a CCL19 y CCL21 cuando se activaron los receptores LXR con el ligando sintético. Por el contrario, observamos que las células dendríticas esplénicas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ fueron incapaces de migrar adecuadamente en respuesta a los gradientes CCL19 y CCL21, sin que el tratamiento con GW3965 modifique su capacidad quimiotáctica. Con estos resultados, confirmamos que las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ presentan un defecto muy significativo en la migración frente a estímulos quimiotácticos.

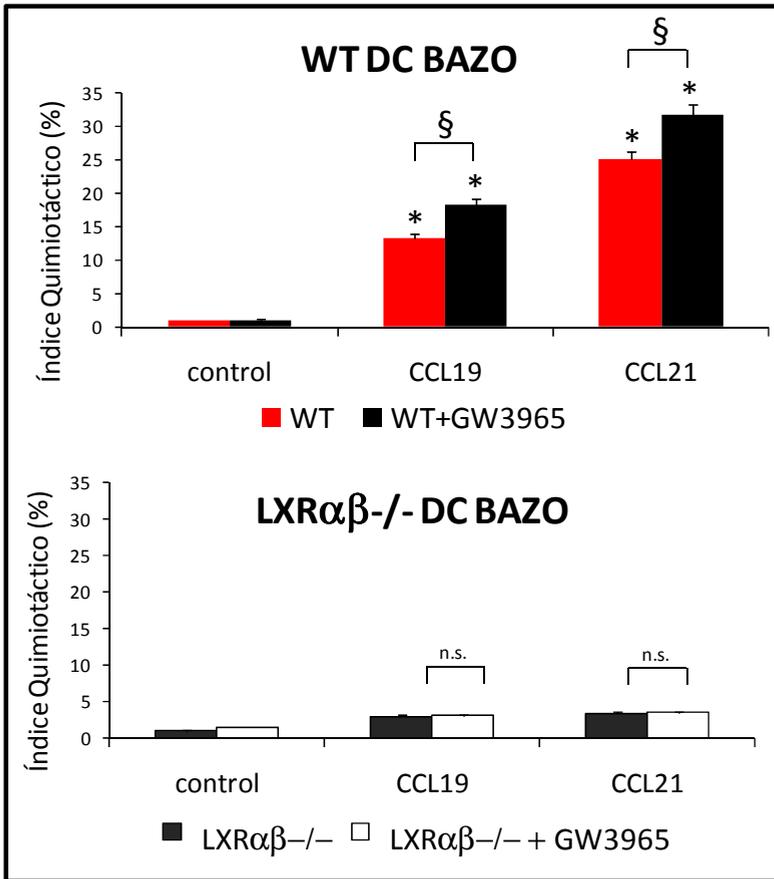


Figura 13.- Defecto en la quimiotaxis de las células dendríticas LXRαβ-/- de bazo. Se obtuvo una suspensión celular a partir del bazo de ratones WT y LXRαβ-/-, que se enriqueció para células dendríticas mediante el uso de bolas inmunomagnéticas acopladas a CD11c, y posterior selección positiva. Las células se trataron con GW3965. Se midió su capacidad quimiotáctica mediante ensayos de quimiotaxis en *transwell*. Se cuantificaron las células migradas a la cámara inferior en respuesta a CCL19 y CCL21. Los resultados se representaron como la media ± la desviación estándar del índice quimiotáctico de tres experimentos independientes, y cada condición experimental se realizó por triplicado. *: p < 0,05, diferencia respecto a WT control. §: p < 0,05, diferencia respecto a WT en respuesta a quimioquinas. n.s.: diferencia no significativa.

4.2.3. Defecto en la migración *in vivo* de las células dendríticas

LXR $\alpha\beta$ -/-

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

Como se aprecia en la figura 14, el número de células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/- (verde) localizadas en el área de linfocitos T de los ganglios poplíteos 24 (figura 14A, B, C, D) y 48 horas (datos no mostrados) tras la inyección de las células, fue significativamente menor en comparación con las células dendríticas WT (rojo). Experimentos similares alternando estos dos colorantes fluorescentes revelaron resultados similares (datos no mostrados). Mediante la cuantificación del número de células fluorescentes LXR $\alpha\beta$ -/- y WT migradas a los ganglios linfáticos poplíteos mediante el análisis de 20 secciones diferentes (figura 14E), se corroboró que el número de células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/- presentes fue considerablemente menor al de células dendríticas WT.

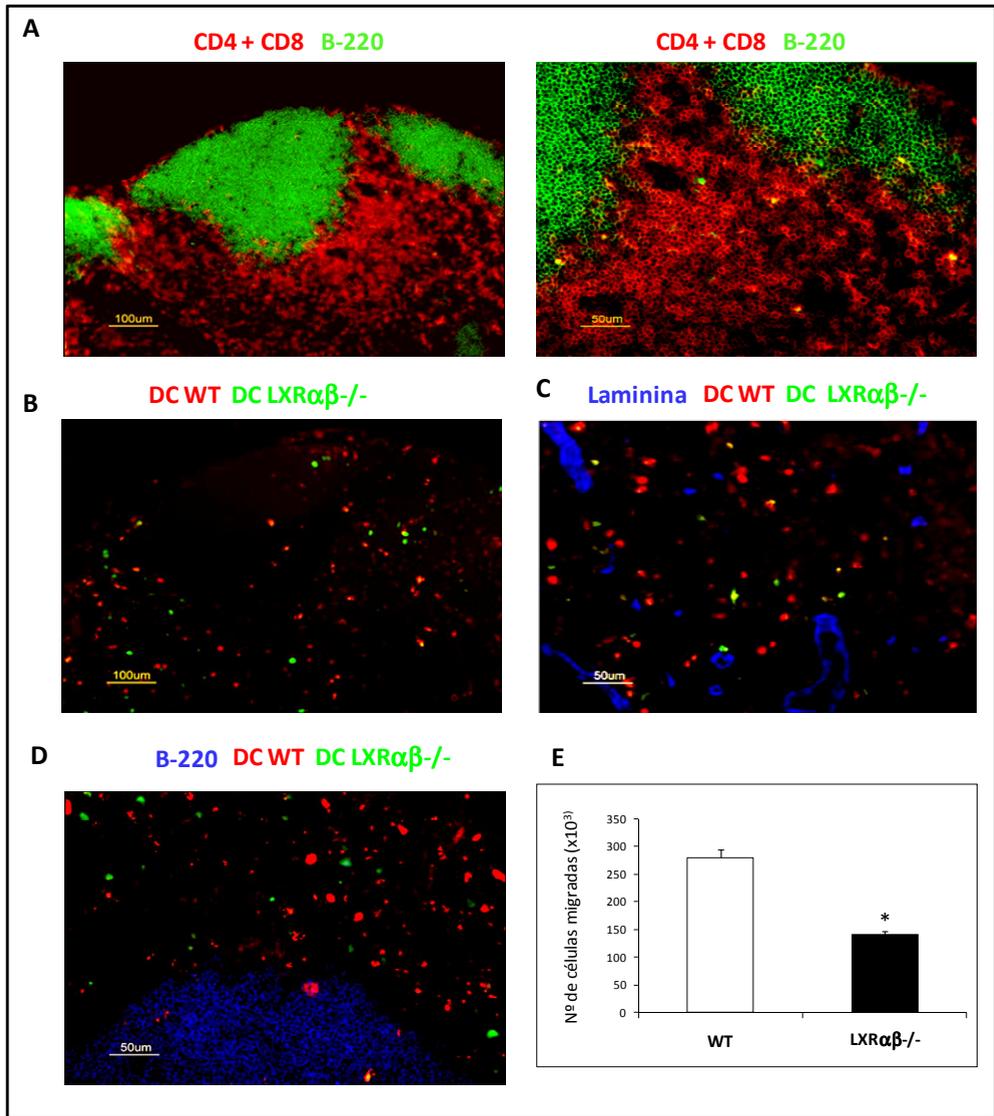


Figura 14.- Defecto en la migración *in vivo* de células dendríticas LXRαβ-/-. Células dendríticas maduras procedentes de ratones LXRαβ-/- y WT se marcaron con los marcadores vitales CMFDA (verde) y CMPTX (rojo), respectivamente, y se inyectaron subcutáneamente en la almohadilla de la pata trasera de ratones WT. Los ganglios linfáticos poplíteos se recogieron a las 24 horas y se tiñeron criosecciones con CD4 y CD8 (A, rojo), B-220 (A, verde; C, azul), y laminina (D, azul), y se examinaron por microscopía de fluorescencia. Aumento 10x y 20x. Se cuantificó el número de células fluorescentes presentes en 20 secciones diferentes de los ganglios drenantes (E). *: p < 0,05, diferencia respecto a WT. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

Con este ensayo de migración *in vivo* confirmamos que existe un defecto significativo en la migración de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ a través de los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos drenantes. Todos estos resultados en conjunto sugieren que los receptores LXR juegan un importante papel en el tráfico de las células dendríticas en respuesta a estímulos quimiotácticos.

5. Análisis de la expresión y vías de señalización de CCR7 en células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$

La relevancia del evento migratorio radica en que las células dendríticas maduras tienen capacidad para migrar desde los tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos con el objetivo de polarizar los linfocitos T de dichos órganos y generar así la respuesta inmune (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998). Esta migración de las células dendríticas hacia las áreas de los linfocitos T requiere la expresión y activación de CCR7, el mediador dominante de la movilización de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos (Forster et al., 1999; Sallusto et al., 1999).

Tras observar que la ausencia de LXR influye de manera muy significativa en la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas, decidimos analizar el nivel de expresión del receptor CCR7 en nuestro modelo celular, con el fin de dilucidar si dicho defecto se debía a alteraciones en la expresión de esta molécula. La respuesta migratoria de la célula dendrítica inducida por quimioquinas a través de CCR7 está regulada por varias rutas de señalización. Tras la unión del ligando al receptor de quimioquinas se desencadena una serie de eventos de transducción encargados de la activación de la célula, seguidos por un aumento de la motilidad.

Son varios los módulos de señalización que se activan tras la unión de CCR7 a sus ligandos. Para determinar si la reducida respuesta quimiotáctica de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ se debe a alteraciones en la expresión de CCR7, analizamos el nivel de expresión de este receptor en células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea procedente de ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Se analizaron los niveles de ARN de CCR7 por qPCR en células dendríticas maduras (LPS) frente a las células dendríticas inmaduras. Como se aprecia en la figura 15A, la expresión de CCR7 es mayor en las células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ maduras respecto a las células inmaduras, con una expresión de CCR7 sensiblemente mayor en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$.

Al igual que se observó en el análisis de ARN, tampoco se apreciaron diferencias en la expresión de CCR7 entre células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ a nivel proteico mediante citometría de flujo (figura 15B) e inmunocitoquímica de fluorescencia (figura 15C). Para el análisis mediante citometría de flujo, células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ se sometieron a maduración con LPS durante 24 horas y se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo frente a CCR7. Como se aprecia en la figura 15B, ambos tipos celulares presentaron una expresión de CCR7 significativa tras la maduración de las células con respecto al isotipo control, sensiblemente mayor en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Estos datos fueron confirmados mediante inmunocitoquímica de fluorescencia (figura 15C), donde se puede apreciar que el número de células dendríticas ($CD11c^+$, verde) WT que co-localizan con células $CCR7^+$ (rojo) es muy similar al que encontramos en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Los resultados obtenidos confirman que las células dendríticas $CD11c^+ LXR\alpha\beta^{-/-}$ tras la maduración, expresan niveles similares del receptor CCR7 al de células WT, por lo que dicha expresión parece no verse afectada por la ausencia de LXR. Por

ello, es muy probable que el defecto quimiotáctico y de migración *in vivo* observado en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ no esté causado por un defecto en la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 (figura 15).

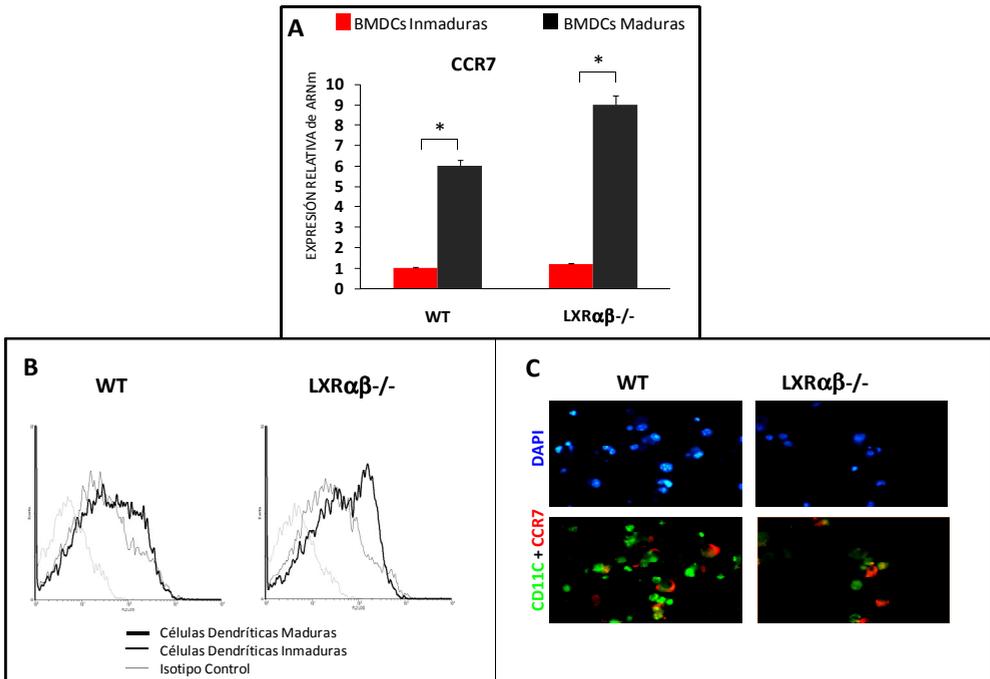


Figura 15.- Similar expresión del receptor CCR7 en las células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$.

Se midió la expresión de CCR7 en células dendríticas procedentes de médula ósea de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT maduras. (A) Mediante qPCR se comparó ARN de células dendríticas maduras frente a inmaduras, de ambos genotipos. Los niveles están normalizados con el gen 36B4. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos. *: $p < 0,05$, diferencia respecto a la muestra control en cada genotipo. (B) Análisis proteico de CCR7 mediante citometría de flujo. El histograma de color gris representa la fluorescencia inespecífica del isotipo control; los histogramas de color negro (tenue y fuerte) representan la fluorescencia correspondiente a las células dendríticas inmaduras y maduras, respectivamente, WT o $LXR\alpha\beta^{-/-}$, marcadas con el anticuerpo frente a CCR7. (C) Análisis proteico de CCR7 mediante inmunocitoquímica de fluorescencia. Las células dendríticas depositadas en un cubreobjetos tratado con polilisina se tiñeron con anticuerpos específicos contra CD11c (verde) y CCR7 (rojo), y se empleó medio de montaje que incluye DAPI, permitiendo su análisis al microscopio de fluorescencia. Aumento 40x.

Los receptores de quimioquinas como CCR7 transmiten señales intracelulares que regulan múltiples funciones biológicas en las células dendríticas a través de la subfamilia G_i de las proteínas G (Thelen M., 2001). Así, CCR7 induce la activación de miembros de la familia de las MAPK, encargados de regular la quimiotaxis de las células dendríticas. De entre estos miembros que forman parte de la familia de las MAPK, destacan las proteínas ERK1/2, p38 y JNK, encargadas de regular, en parte, la quimiotaxis de las células dendríticas (Iijima et al., 2005; Riol-Blanco et al., 2005; Shin et al., 2006). Otras proteínas, como PI3K/AKT, regulan la supervivencia dependiente de CCR7 en las células dendríticas, pero además se ha descrito que también están involucradas en la regulación de la quimiotaxis en diferentes tipos celulares (Wong et al., 2003). Tras comprobar que el defecto quimiotáctico de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ no se corresponde con una alteración en la expresión del receptor CCR7, nos planteamos analizar la expresión y activación de algunas de las proteínas involucradas en los mecanismos de señalización inducidos por CCR7. Con el fin de analizar parte de las vías de señalización reguladas por CCR7 en nuestro modelo celular, estudiamos por *Western-Blot* el grado de activación/fosforilación de ERK1/2 y AKT en células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$, bajo la estimulación con los ligandos de CCR7. Las células dendríticas maduras de ambos genotipos fueron estimuladas con CCL19 (figura 16) y CCL21 (datos no mostrados), a una concentración de 200 ng/ml durante diferentes periodos de tiempo (0, 2, 5, 10 y 15 minutos).

La señalización inducida por ambas quimioquinas resultó en una transitoria y potente activación de ERK1/2 en las células dendríticas WT (figura 16, pERK), en los primeros 10 minutos de estimulación. Por el contrario, la fosforilación de ERK fue menor en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$, tanto a nivel

basal como tras la estimulación de las células con CCL19. Con el objetivo de analizar la expresión de moléculas involucradas en la quimiotaxis y que puedan estar afectadas en nuestro modelo, estudiamos la activación de AKT tras la estimulación de CCR7 con sus ligandos en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT. Como se observa en la figura 16, la presencia de CCL19 induce un potente incremento en la fosforilación de AKT, tanto en células WT como en $LXR\alpha\beta^{-/-}$.

Estos datos demuestran, por un lado, que LXR es importante para la señalización quimiotáctica que conduce a la activación de ERK1/2 y, por otro lado, que la activación de AKT parece independiente de LXR, por lo que no todas las vías de señalización orquestadas por CCR7 se ven afectadas por la ausencia de dicho receptor. Con estos resultados podemos afirmar que LXR es necesario para la óptima activación de algunos miembros de la familia de MAPK en las células dendríticas, y refuerza la hipótesis de la existencia de diferentes módulos que regulan la quimiotaxis y la supervivencia de las células dendríticas (Riol-Blanco et al., 2005; Sanchez-Sanchez et al., 2004). La correcta expresión de CCR7 y la disminución de la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a CCL19 observada en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ permite pensar que LXR puede estar involucrado en la regulación de la expresión de una o varias moléculas co-reguladoras de la señalización quimiotáctica.

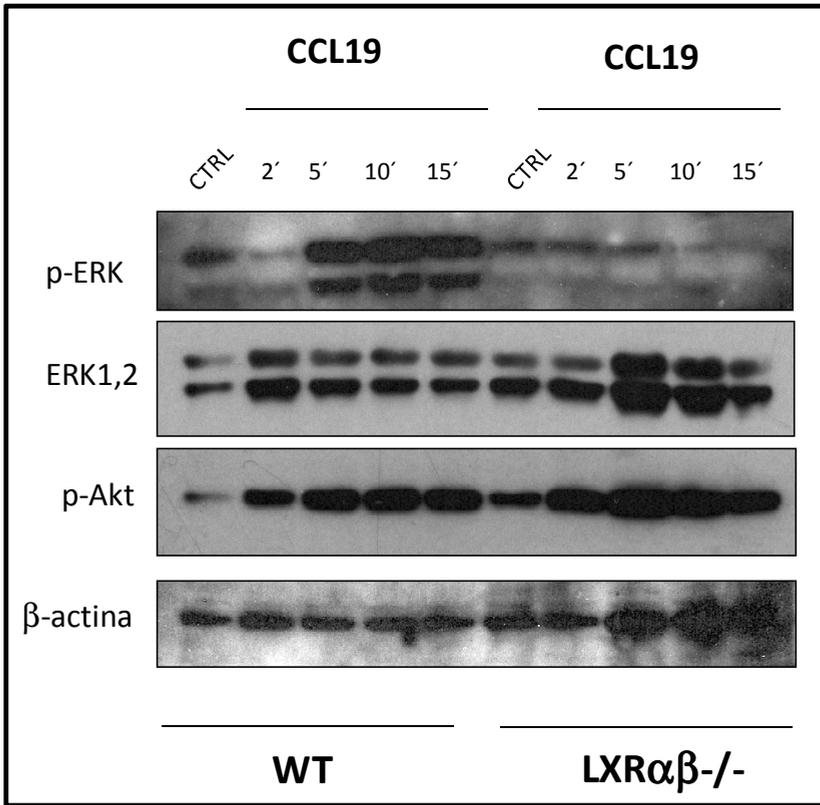


Figura 16.- LXR está implicado en la quimiotaxis de las células dendríticas a través de la regulación de ERK1/2. Células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} maduras (LPS, 24 horas) se estimularon durante los tiempos indicados con CCL19 (200 ng/ml). Se analizaron los extractos proteicos por SDS-PAGE, seguido de *Western-Blot* con los anticuerpos contra p-ERK1/2, ERK1/2 total, p-AKT y β -actina (para conocer la carga total de proteína).

6. Actividad transcripcional de los receptores LXR en células dendríticas: Análisis de microarrays

Para investigar los efectos transcripcionales de la actividad de LXR en las células dendríticas de ratón, se llevó a cabo un análisis de microarrays de genoma completo, con el fin de ahondar en la implicación de LXR en funciones de las células dendríticas, como la maduración y la migración. De este modo, nuestro interés se centró en analizar el perfil de expresión génica de las células dendríticas WT tras la activación de los receptores LXR por ligandos sintéticos, así como comparar las diferencias de expresión génica de células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} durante la diferenciación y maduración de las mismas.

Con el objetivo de investigar los efectos diferenciales de LXR se empleó la tecnología microarrays de ARN *Affymetrix 430 v2.0*, que permite el análisis simultáneo de la expresión de miles de genes. Este análisis de expresión génica se diseñó en células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, diferenciadas durante 7 días con la citoquina GM-CSF, y finalmente estimuladas con LPS (500 ng/ml) durante 24 horas. El efecto de la activación de LXR se realizó mediante el tratamiento de células dendríticas WT maduras con los ligandos sintéticos GW3965, 1 μ M, o vehículo (control), en los días 5 y 7 de diferenciación.

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software *GeneSpring GX 7.3 software* (Agilent Technologies), realizando las comparaciones indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparaciones efectuadas con el software *GeneSpring GX 7.3 software* (Agilent Technologies)

Análisis 1
DC WT Inmaduras vs DC WT Maduras
DC LXR$\alpha\beta$^{-/-} Inmaduras vs DC LXR$\alpha\beta$^{-/-} Maduras
Análisis 2
DC WT Maduras vs DC WT Maduras + GW3965 (1μM)

Para determinar qué genes se encontraban diferencialmente expresados en cada grupo, se ajustaron los p-valores y se consideraron significativos todos aquellos genes cuya expresión reflejase diferencias de ≥ 2 veces con respecto al control. Los resultados del análisis de microarrays *Affymetrix 430 v2.0* se han dividido en dos partes. En la primera se analizan las diferencias de expresión génica existentes entre las células dendríticas WT y las células LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, inmaduras frente a maduras. En la segunda parte, nos centramos en el estudio del efecto de la activación de LXR en las células dendríticas WT, comparando los resultados obtenidos entre las células dendríticas WT maduras sin estimular y estimuladas con los ligandos de LXR.

6.1. Análisis de genes dependientes de la activación de células dendríticas

Los resultados obtenidos en el análisis de microarrays y que se muestran en este trabajo incluyen sólo genes que se han regulado de manera diferencial con la maduración de las células, en ambos genotipos. Estos genes se han agrupado en diferentes familias y se muestran en la Tabla 2. El set de genes modulados por LPS

que mostramos es consistente con los trabajos previos existentes (Cao et al., 2006; Huang et al., 2001; Perrier et al., 2004; Vizzardelli et al., 2006). De este modo, como se esperaba, la maduración de las células dendríticas con el ligando de TLR4 promueve la expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas (por ejemplo, CCL1, CXCL3, CXCL6, CXCL10 y CCR7), y citoquinas (por ejemplo, IL-12A, IL-12B, IFN- γ , e IFN-1 β). La lista incluye genes cuya regulación en ambos genotipos es similar, como metalopeptidasas y moléculas de adhesión, mediadores inmunoinflamatorios, como TNF y receptores de citoquinas. Como ya apreciamos anteriormente, la expresión de CCR7 incrementa tras la maduración, siendo sensiblemente mayor en las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}.

Tabla 2.- Genes regulados por LPS en células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Se muestran los genes que están diferencialmente expresados en células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} tras la maduración con LPS, respecto a las células inmaduras (ED, expresión diferencial). Se han agrupado los genes estructural y funcionalmente.

SÍMBOLO GEN	Nº Acceso GenBank	WT Maduras vs Inmaduras (ED)	LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} Maduras vs Inmaduras (ED)
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN			
Cd86	NM_019388	2,20	2,46
CD40	NM_011611	6,96	8,00
CD14	NM_009841	3,73	5,28
BIRC3	NM_007464	1,35	1,18
Cd80	D16220	2,10	2,00

Tabla 2 (continuación).- Genes regulados por LPS en células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ -/-.

SÍMBOLO GEN	Nº Acceso GenBank	WT Maduras vs Inmaduras (ED)	LXR $\alpha\beta$ -/- Maduras vs Inmaduras (ED)
QUIMIOQUINAS/RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS			
CCL6	NM_009139	1,12	0,99
CCR8	NM_007720	1,95	1,03
CCR5	NM_009917	1,05	0,37
SOCS1	NM_009896	1,35	1,18
CCR7	NM_007719	4,20	5,98
CXCL16	BC019961	8,5	3,5
CCL5, RANTES	NM_013653	11,82	4,39
CD38	BB256012	6.3	2.8
CXCL3	BB207363	8,7	34,3
CCL3, MIP-1α	NM_011337	3,40	14,00
CCL2, MCP-1	NM_011333	4,50	11,18
CXCL10	NM_021274	3,7	5,6
CCR1, MIP1αR	NM_009912	1,24	1,01
CCR2	NM_009915	0,22	0,41
IL8Rβ	NM_009909	0,47	0,20
CCR5	NM_009917	0,90	0,35
CXCR4	NM_009911	1,02	2,33

Tabla 2 (continuación).- Genes regulados por LPS en células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ -/-.

SÍMBOLO GEN	Nº Acceso GenBank	WT Maduras vs Inmaduras (ED)	LXR $\alpha\beta$ -/- Maduras vs Inmaduras (ED)
SEÑALIZACIÓN			
Socs3	NM_007707	2,64	4,92
Nfkbiz	AB026551	4,00	3,73
TNF	NM_013693	2,83	2,14
IFNAR2	AF013486	2,00	1,52
IL12α	AF128210	14,93	28,96
IL12β	AF128214	3,48	24,25
JAK1	BQ032637	1,32	1,32
Stat1	AW214029	3,48	2,64
REMODELACIÓN TEJIDOS/ESTRÉS			
Mmp3	NM_010809	9,85	7,46
Mmp14	NM_008608	3,48	3,03
Mmp9	NM_013599	3,03	2,3
Col5a1	AW744319	2,30	4,00

6.2. Estudio de la regulación de genes en células dendríticas tras la activación de los receptores LXR

La regulación transcripcional de los receptores LXR sobre las células dendríticas también se estudió mediante estudios de microarrays analizando el efecto de la activación de LXR en células dendríticas. Para ello, las células dendríticas WT maduras se trataron con el ligando sintético GW3965, 1 μ M, o vehículo (control), en los días 5 y 7 de diferenciación. En la figura 17 hemos representado únicamente los genes que exhiben significativamente mayor inducción tras la activación de los receptores LXR, como genes diana de LXR implicados en el metabolismo de los esteroides, moléculas de adhesión celular, moléculas implicadas en la migración, quimioquinas, etc. De este modo, se comprueba que los ligandos de LXR y RXR no sólo regulan genes implicados en el metabolismo de los lípidos, sino que también influyen en la expresión génica de un importante número de genes implicados en procesos de respuesta inmune, como la inflamación y la quimiotaxis.

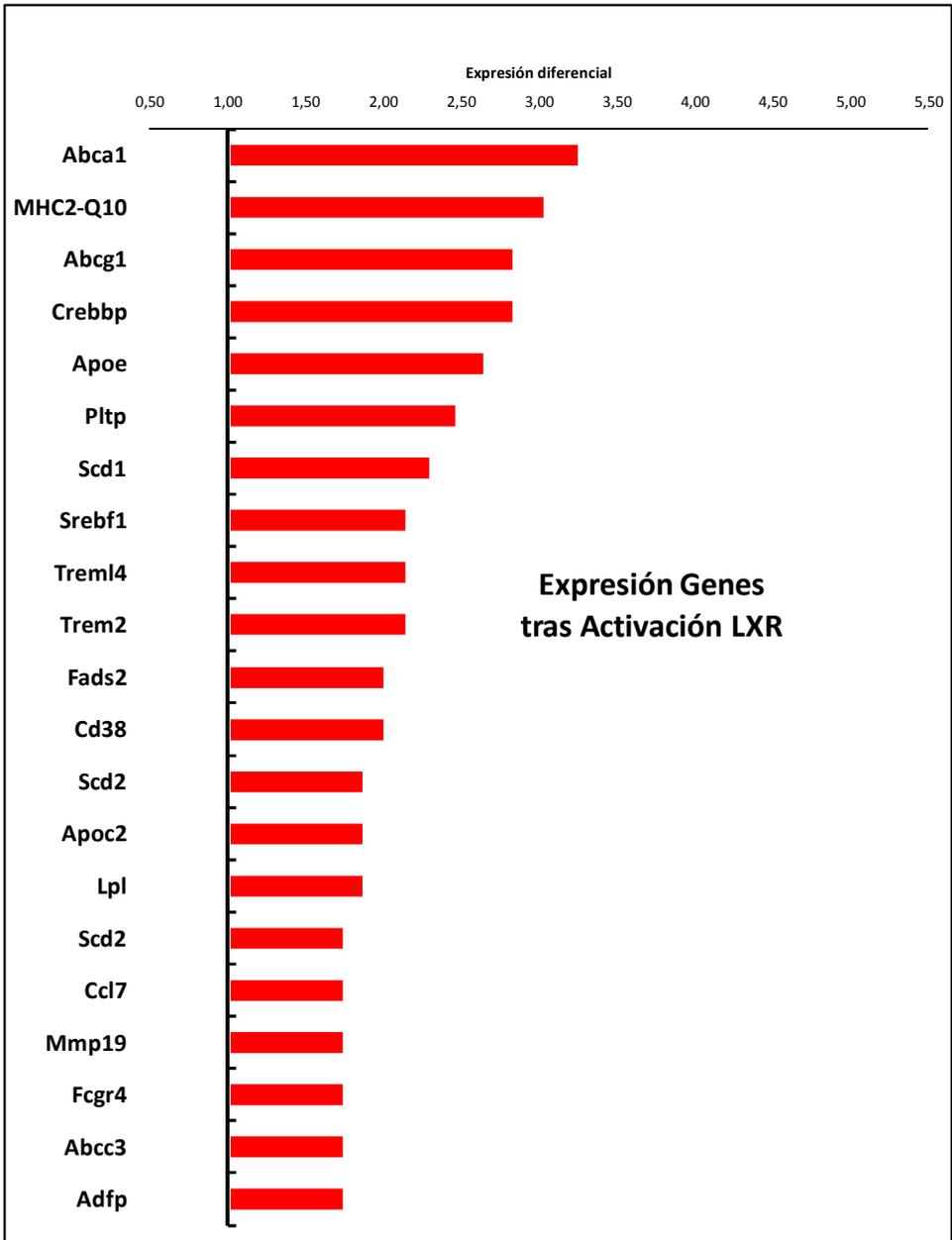


Figura 17.- Representación de los principales genes regulados por la activación de LXR. Se muestran los genes que están diferencialmente expresados en células dendríticas WT maduras tras la activación de LXR con los ligandos sintéticos GW3965, 1 μ M, con respecto a las células WT control, tratadas con el vehículo (DMSO). Únicamente se han representado los genes cuya expresión más se induce tras el tratamiento.

6.3. La expresión de CD38 en células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} está disminuida

Con el objetivo de validar los resultados de los microarrays y analizar en profundidad la expresión de algunos genes dependientes de LXR, se realizaron diferentes qPCR de los principales genes regulados por LXR en las mismas, y de CD38, gen implicado en el evento migratorio y que se identificó en ambos microarrays como un posible nuevo gen diana de LXR. Se analizó la expresión génica de CD38 y de ABCA1, ABCG1 y SREBP1c, genes diana de LXR, en células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} maduras e inmaduras.

Como puede apreciarse en la figura 18, mediante qPCR confirmamos la expresión diferencial de estos genes en células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} durante su diferenciación y maduración. Los genes ABCA1 y CD38 incrementan su expresión en células dendríticas WT. Por el contrario, las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} presentan una considerable disminución de la expresión de ABCA1, ABCG1, SREBP1c y CD38, independientemente del estado de maduración en que se encuentren. Confirmamos los resultados obtenidos en los microarrays en cuanto a la regulación del gen CD38, cuya expresión en las células dendríticas WT aumenta considerablemente tras la maduración de las células, mientras que dicha expresión es inferior en células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}.

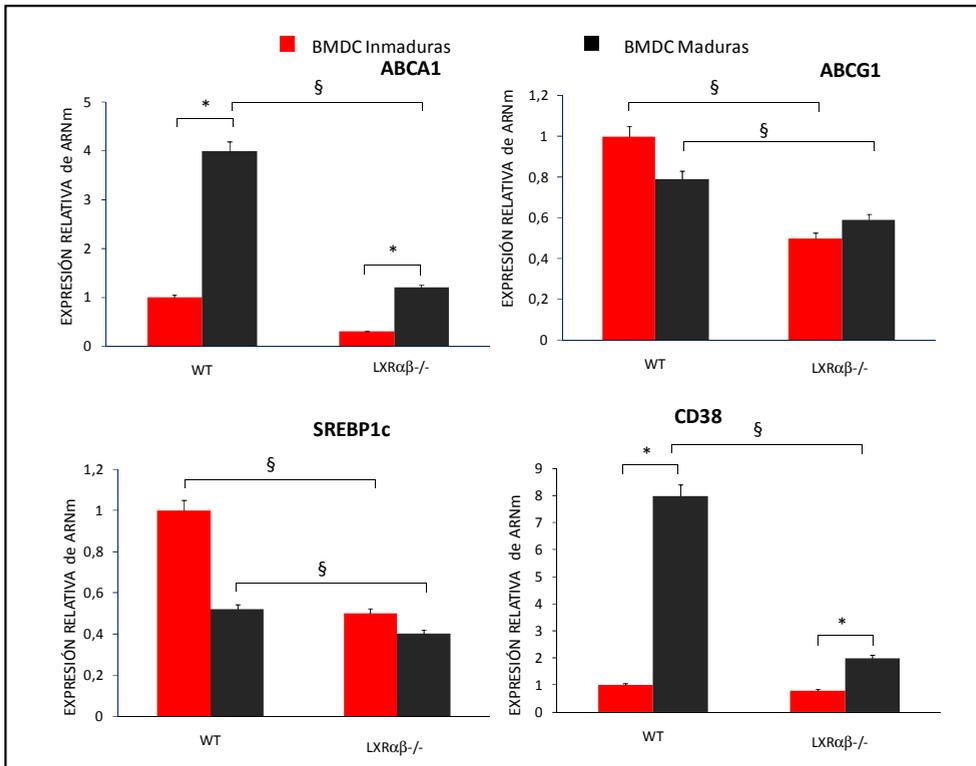


Figura 18.- Validación de los datos obtenidos en los microarrays. Células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} y WT se diferenciaron durante 7 días con GM-CSF (BMDC Inmaduras), y posteriormente se trataron con LPS (BMDC Maduras) durante 24 horas. El ARN se analizó mediante qPCR. Los niveles están normalizados con el gen 36B4. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos. *: $p < 0,05$, diferencia respecto a BMDC inmaduras en cada genotipo. §: $p < 0,05$, diferencia respecto a WT (BMDC inmaduras, y maduras).

También se analizó la expresión de estos mismos genes tras la activación de LXR en células dendríticas derivadas de progenitores de médula ósea de ratones WT tratados con los ligandos sintéticos de LXR y RXR (GW3965 y LG268, respectivamente).

El análisis de ABCA1, ABCG1, SREBP1c y CD38 por qPCR muestra un incremento de la expresión génica tras la exposición de estas células a los ligandos de LXR (figura 19). Sin embargo, solamente los genes ABCA1 y CD38 incrementaron su expresión tras el estímulo de maduración sin el tratamiento con los ligandos (BMDC Maduras), como ya habíamos observado en anteriores experimentos (figuras 5, 6 y 18).

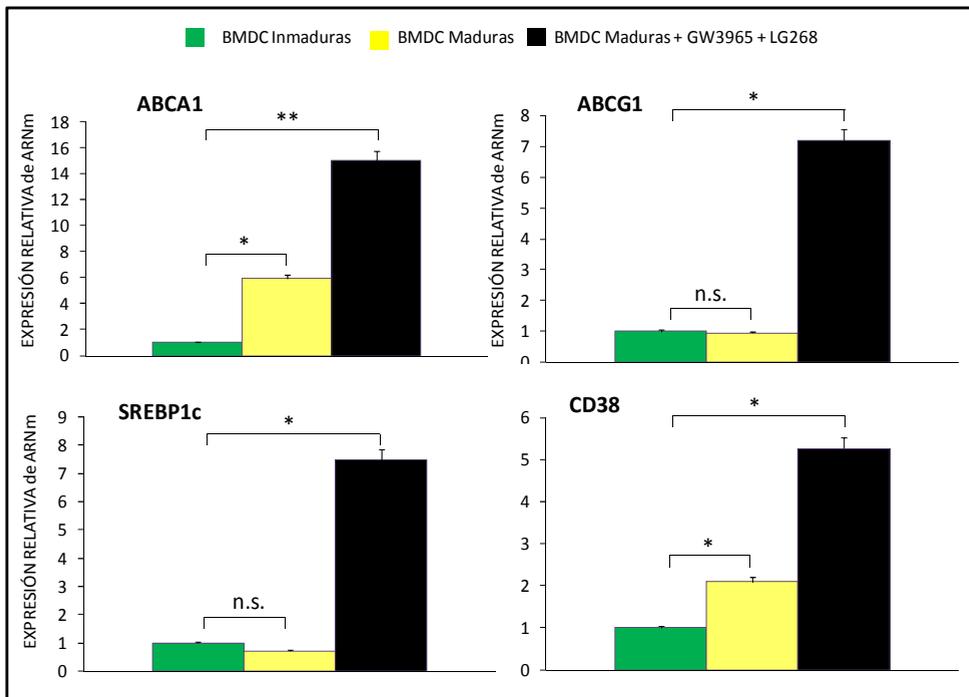


Figura 19.- Comprobación de la regulación dependiente de LXR de conocidos genes diana de LXR como ABCA1, ABCG1, SREBP1c y CD38. Se analizó el ARN de células dendríticas diferenciadas a partir de progenitores de médula ósea de ratones WT en presencia de la citoquina GM-CSF (BMDCs inmaduras), sometidas a maduración con LPS durante 24 horas (BMDCs maduras), y maduras tratadas con los ligandos sintéticos de LXR (BMDCs maduras + GW3965 + LG268), mediante qPCR. Los niveles están normalizados con el gen 36B4. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, diferencia respecto a BMDC inmaduras. n.s.: diferencia no significativa.

El hallazgo del defecto migratorio que presentan las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ encaminó este trabajo hacia el estudio del evento migratorio, así como de las moléculas y vías de señalización reguladas por CCR7 implicadas en este fenómeno.

El análisis de la migración *in vivo* de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ demostró que el tráfico de las células dendríticas desde la piel hacia los ganglios linfáticos tras la aplicación epicutánea de FITC está significativamente alterada en los ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Estos resultados se confirmaron *in vitro* mediante ensayos de quimiotaxis, e *in vivo* al observar que las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ migraron escasamente hacia los ganglios linfáticos cuando se inyectaron en ratones WT. En concreto, las células dendríticas inmaduras de cultivos de progenitores procedentes de médula ósea de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ fueron incapaces de migrar en respuesta al ligando de CXCR4 CXCL12. Del mismo modo, las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ no migraron eficientemente en respuesta a los ligandos de CCR7 CCL19 y CCL21.

Este defecto en la migración no se debe a una incapacidad de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ a madurar en respuesta a LPS, ya que se observa un correcto incremento de la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, así como del receptor CCR7. Sin embargo, parece que las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ son refractarias a la señalización del receptor de quimioquinas CCR7. Como se ha podido comprobar al analizar alguna de las vías de señalización activadas por quimioquinas, es probable que LXR participe en la regulación de las señales dependientes de CCR7 responsables de la quimiotaxis. Esta hipótesis se basa en el hecho de que la activación de la quinasa ERK1/2, implicada en la migración de las

células dendríticas, en respuesta a estímulos quimiotácticos se encuentra disminuida en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$.

No obstante, y como también se ha comentado ya en la introducción de este trabajo, está establecido que la expresión de CCR7 es una señal necesaria pero no única para que tenga lugar la migración de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos. Es por ello, que la respuesta de CCR7 requiere de señales coordinadas que induzcan una respuesta de este receptor a sus ligandos. Diversos estudios han identificado que la funcionalidad de CCR7 de superficie requiere precursores, como mediadores lipídicos (prostaglandina E2, leucotrienos) (Robbiani et al., 2000; Scandella et al., 2002), y NAD^+ , sustrato de la ecto-enzima CD38 (Partida-Sanchez et al., 2004). La principal función de CD38 es producir el metabolito movilizante de calcio cADPR a partir de su sustrato, NAD extracelular. Este metabolito regula diversas funciones dependientes de calcio en monocitos, neutrófilos y células dendríticas activadas, participando así en la migración de estas células hacia los sitios de inflamación y tejidos linfoides secundarios (Partida-Sanchez et al., 2001; Partida-Sanchez et al., 2004; Partida-Sanchez et al., 2003).

Como hemos podido apreciar en el análisis de microarrays y posteriormente por qPCR, las células dendríticas procedentes de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ presentan una expresión reducida de CD38 tras la maduración, en comparación con las células dendríticas procedentes de ratones WT. Además, cuando LXR es activado por sus ligandos sintéticos se observa un incremento considerable de la expresión de esta enzima en las células dendríticas WT. Es por ello que postulamos que la expresión de CD38 depende en parte de la actividad de LXR en las células dendríticas, que puede estar contribuyendo a la migración de las mismas.

Para un análisis más profundo de la expresión de CD38 en nuestro modelo, analizamos también la expresión de CD38 en células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ y WT, mediante citometría de flujo (figura 20A) e inmunocitoquímica de fluorescencia (figura 20B), empleando un anticuerpo específico frente a CD38. Como se aprecia en la figura 20A, mediante citometría de flujo comprobamos que CD38 presenta una expresión significativamente menor en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ en comparación con las células dendríticas WT.

Estos datos fueron confirmados mediante inmunocitoquímica de fluorescencia (figura 20B), donde pudimos apreciar una expresión de CD38 (rojo) significativamente superior en células dendríticas $CD11c^{+}$ (verde) procedentes de ratones WT en comparación con las células $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Estos datos indican que la expresión de CD38 en células dendríticas está regulada en parte por los receptores LXR.

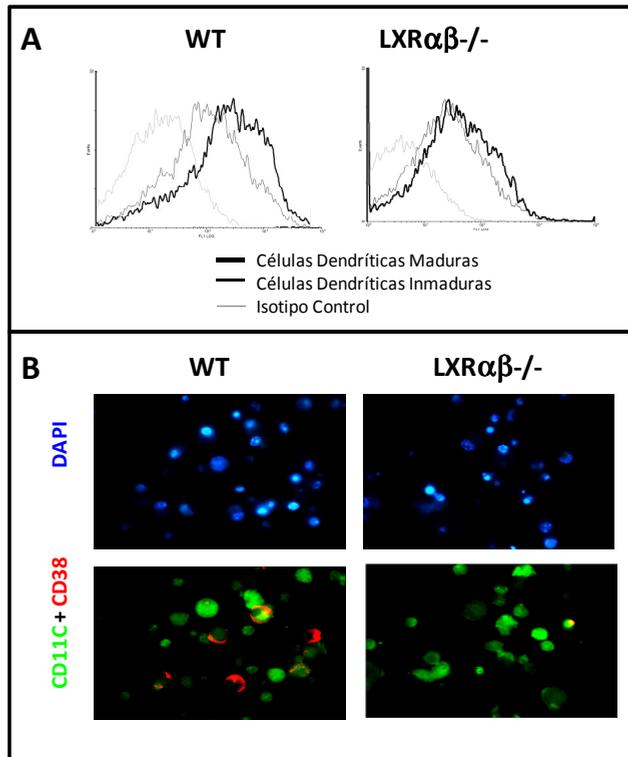


Figura 20.- La expresión de CD38 es dependiente de LXR. Se analizó la expresión de CD38 en células dendríticas procedentes de médula ósea de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} y WT maduras. (A) Análisis de la expresión de CD38 mediante citometría de flujo. El histograma de color gris representa la fluorescencia inespecífica del isotipo control; los histogramas de color negro (tenue y fuerte) representan la fluorescencia correspondiente a las células dendríticas inmaduras y maduras, respectivamente, WT o LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, marcadas con el anticuerpo frente a CD38. (B) Análisis proteico de CD38 mediante inmunocitoquímica de fluorescencia. Las células dendríticas depositadas en cubreobjetos de cristal y tratados con polilisina se tiñeron con anticuerpos específicos contra CD11c (verde) y CD38 (rojo). Se empleó medio de montaje que incluye DAPI, y las muestras se analizaron al microscopio de fluorescencia. Aumento 40x.

7. Regulación de la expresión de CD38 por heterodímeros LXR/RXR

CD38 es una molécula de la superficie celular que actúa como una ectoenzima capaz de producir cADPR (*cyclic adenosine diphospho (ADP)-ribose*) a partir de NAD⁺ (*nicotinic acid adenine dinucleotide*). CD38 se expresa de forma variable en células del linaje linfoide y mieloide (Fernandez et al., 1998; Malavasi et al., 1992), y su expresión aumenta en respuesta a estímulos inflamatorios (Bauvois et al., 1999; Musso et al., 2001,) participando en la regulación de la respuesta inmune a través de la producción de metabolitos movilizantes del calcio (Lund et al., 2006). Además de estar involucrado en la capacidad para generar la respuesta inflamatoria innata frente a infecciones (Partida-Sanchez et al., 2001; Partida-Sanchez et al., 2003), CD38 participa en la regulación de la migración de los leucocitos en respuesta a diferentes quimioatrayentes endógenos y quimioquinas.

Estudios de pérdida de función en ratones CD38^{-/-} han revelado la existencia de un defecto intrínseco en la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas a una serie de quimioquinas (Partida-Sanchez et al., 2004). Concretamente, las células dendríticas CD38^{-/-} inmaduras son incapaces de migrar en respuesta a CXCL12 (ligando de CXCR4) y CCL2 (ligando de CXCR2). Además, las células dendríticas CD38^{-/-} maduras *in vitro* con TNF α no migran eficientemente en respuesta a CCL19 y CCL21 (ligandos de CCR7), y estas mismas células aisladas de bazo no pueden migrar en respuesta a CCL19, CCL21, y CXCL12 (Partida-Sanchez et al., 2004). De forma similar a lo observado en nuestro laboratorio, este defecto quimiotáctico observado en las células dendríticas CD38^{-/-} no se debe a una alteración en la maduración de las células dendríticas, que expresan niveles adecuados de CCR7 y moléculas co-estimuladoras. Mediante experimentos *in vivo*

se ha confirmado que el tráfico de los precursores de las células dendríticas, desde la sangre hacia la piel, está significativamente alterado en ratones carentes de CD38. Estos resultados son consistentes con el hecho de que CD38 es necesario para la migración de los precursores de las células dendríticas hacia la piel dependiente de CCR2 (Partida-Sanchez et al., 2004). También se ha observado que los ratones CD38^{-/-} presentan alteraciones en el tráfico de las células dendríticas desde la piel hacia los ganglios linfáticos tras realizar el ensayo “FITC painting”. Todos estos datos indican que CD38 participa en la regulación de la quimiotaxis de las células dendríticas hacia los ligandos de CCR7, y que esta migración de las células de Langerhans desde la piel hacia los ganglios linfáticos después de la aplicación de FITC es altamente dependiente de CCR7 (Forster et al., 1999); Gunn et al., 1999).

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio al analizar la respuesta migratoria de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} coinciden con los datos existentes acerca de la migración de las células dendríticas CD38^{-/-}, por lo que nos planteamos que exista una posible relación entre CD38 y LXR. El análisis de la expresión de CD38 a nivel de ARN y proteínas revela que esta molécula está regulada, al menos en parte, por los receptores nucleares LXR. Todos estos datos, en conjunto, permiten afirmar que la menor expresión de CD38 en las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} podría influir, junto con otros factores, en el defecto migratorio que hemos observado *in vivo* e *in vitro* en dicho genotipo.

7.1. Análisis del promotor de CD38

Llegados a este punto, nos cuestionamos si la regulación de la expresión de CD38 está controlada directamente por el heterodímero LXR/RXR. El sitio de unión a LXR/RXR es un elemento de respuesta hormonal DR-4 (repetición directa con un espacio de cuatro nucleótidos) (Willy et al., 1995). En la figura 21A se representa un alineamiento del promotor de CD38 de ratón. El análisis de la región promotora 5'-proximal de dicho gen identificó un elemento de respuesta potencialmente válido para la unión del heterodímero LXR/RXR a 2 kb del sitio de iniciación de la transcripción. El elemento DR-4 presente entre los pares de bases -2025 -2010 está altamente conservado en el promotor de rata y de ratón. El elevado grado de conservación de este elemento en distintas especies (ratón, rata, humano) sugiere que esta secuencia reguladora tiene una importancia significativa (figura 21B).

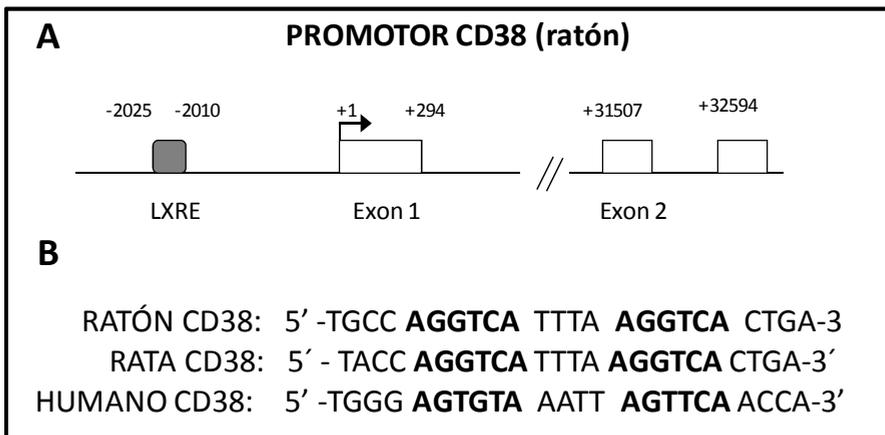


Figura 21.- Análisis del promotor de CD38. El análisis del promotor de CD38 reveló un potencial LXRE a 2kb del sitio de inicio de la transcripción (A). Se muestra un alineamiento de los promotores de CD38 de ratón, rata y humano (B).

Para analizar la unión *in vitro* entre heterodímeros LXR/RXR y esa secuencia de ADN encontrada se realizó un ensayo de retardo en gel (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*), empleando proteínas LXR y RXR y oligonucleótidos marcados radiactivamente.

El análisis de EMSA (figura 22) confirmó que *in vitro* las proteínas LXR y RXR se unen como heterodímeros al oligonucleótido marcado radiactivamente, que contiene este LXRE en el promotor de CD38 del ratón. Como control se empleó una secuencia específica del gen SREBP1c diana de LXR, donde comprobamos esa unión a LXR. También observamos la especificidad de esta interacción al añadir a la reacción un anticuerpo específico frente a RXR α , lo que generó un complejo de masa molecular superior, resultando en una disminución de la movilidad del complejo proteína-ADN (*supershift*). Además, la especificidad de la reacción de unión de LXR con la secuencia usada se evaluó realizando un ensayo de competición, añadiendo un exceso de oligonucleótidos sin marcar (sonda fría) junto con la sonda marcada. De esta forma, observamos que la unión de los heterodímeros a la secuencia de ADN se impidió con un exceso (20-100 veces de exceso molar) de sonda fría (competidor específico sin marcar), revelando así la afinidad y especificidad de este LXRE por LXR/RXR. También se empleó una sonda mutada de CD38 en exceso que fue incapaz de competir con la sonda radiactiva específica.

anteriormente para experimentos de ChIP (Alonso-Gonzalez et al., 2009). Además, la activación de LXR/RXR con ligandos sintéticos en estas células conduce a un incremento en la expresión de los genes diana de LXR, y también de CD38. Por tanto, para estos experimentos de ChIP decidimos utilizar este modelo celular previamente validado en nuestro laboratorio. Estas células fueron estimuladas durante 1 hora con GW3965 y sometidas a *crosslinking* y sonicación; y posteriormente, se inmunoprecipitaron los complejos de ADN con diferentes anticuerpos, que incluyen: IgG como control, anti-CBP, anti-RXR α , anti-AcH3 y anti-N-CoR. Para comprobar si los fragmentos de ADN inmunoprecipitados de células estimuladas con GW3965 contienen el LXRE del promotor de CD38 descrito anteriormente, se emplearon cebadores específicos para esa zona reguladora. Como control positivo se utilizaron cebadores que amplifican la región que contiene el sitio DR-4 de SREBP-1c.

Como se observa en la figura 23, RXR α se encuentra presente en la zona del sitio DR-4 del promotor de SREBP1c, y el tratamiento con GW3965 conduce a un incremento significativo en la cantidad de RXR α unido a esa zona del promotor. Hay que señalar que, hasta ahora, no existe un anticuerpo comercial que reconozca LXR de ratón, por lo que hemos empleado el anticuerpo de RXR α previamente validado para ChIP (Wagner et al., 2003).

La región del promotor de CD38 que contiene el sitio DR-4 previamente identificado muestra también un enriquecimiento en RXR α en células sin estimular con ligando. Tras el tratamiento con GW3965 se observa un reclutamiento mayor de RXR α , lo que induce a pensar en un incremento en la presencia del heterodímero LXR/RXR en el promotor de CD38.

Otra manera de comprobar la actividad del heterodímero LXR/RXR en esa zona del promotor es a través del análisis de proteínas co-represoras como N-CoR (Chen and Evans, 1995). Así, para determinar si el heterodímero LXR/RXR recluta co-represores al promotor de CD38, se diseñó un ensayo de CHIP con anticuerpos específicos para N-CoR. Como observamos en la figura 23, en ausencia de ligando, N-CoR se encuentra asociado al promotor de CD38 en este modelo celular. La activación de LXR con el agonista reduce significativamente la asociación de N-CoR con esa zona del promotor, observándose resultados similares con el promotor de SREBP1c.

N-CoR y otras proteínas co-represoras reprimen la transcripción de multitud de genes a través del reclutamiento de deacetilasas de histonas hacia los promotores diana, por lo que analizamos mediante CHIP la acetilación de la histona H3. En el modelo celular empleado, la acetilación de la histona es mínima en el promotor de CD38 y SREBP1c en ausencia de ligando. Al añadir el ligando sintético, se produce un incremento de la actividad de H3. Además, la estimulación de LXR con el ligando se asoció con el reclutamiento de proteínas co-activadores como CBP/300 en el promotor de CD38, y en el promotor de SREBP1c (figura 23). El análisis de CHIP del promotor de CD38 sugiere que el reclutamiento de proteínas co-represoras y co-activadoras está mediado, en gran parte, por LXR, y que la unión del agonista induce la disociación del co-represor o incrementa el reclutamiento del co-activador, liderando la acetilación de la histona y disminuyendo la represión transcripcional, o bien aumentando el reclutamiento de complejos co-activadores, incrementando así la actividad transcripcional. De este modo, con estos resultados obtenidos podemos confirmar que CD38 se comporta como un gen regulado por LXR.

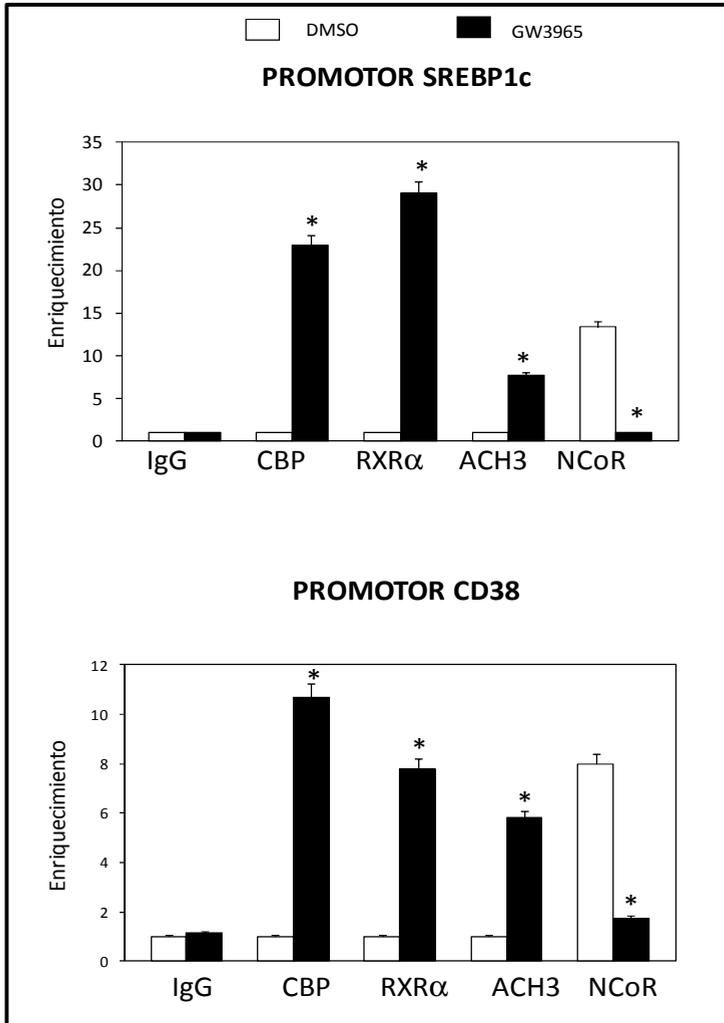


Figura 23.- Unión de RXR α , N-CoR, ach3 y CBP en el promotor de SREBP1c y CD38. Análisis mediante ChIP de la interacción de estas proteínas con LXRE en los promotores de CD38 y SREBP-1c en células RAW264.7-LXR α estimuladas durante 90 minutos con GW3965. El anticuerpo anti-IgG se empleó como control negativo. Se diseñó qPCR con cebadores específicos y SYBRgreen. *: $p < 0,05$, diferencia respecto a la muestra DMSO para cada anticuerpo.

7.2. CD38 contribuye al defecto migratorio y quimiotáctico observado en células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$

Como se comentó anteriormente, estudios previos han demostrado el papel de CD38 en el tráfico de las células dendríticas desde los sitios de inflamación hacia los ganglios linfáticos drenantes a través de la señal de CCR7 (Partida-Sanchez et al., 2004). Esta actividad de CD38 implica la regulación de la movilización del calcio en respuesta a señales migratorias en células dendríticas, fenómeno necesario para la quimiotaxis de estas células. La actividad enzimática de CD38 se traduce en la síntesis de metabolitos movilizantes de calcio a partir de $NAD(P^+)$, incluyendo ADPR (Howard et al., 1993), $NAADP^+$ (*nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*) (Lee et al., 1995), y cADPR (*cyclic ADP-ribose*). El tratamiento de las células dendríticas o neutrófilos con 8-Br-cADPR (Walseth et al., 1993) un antagonista competitivo de cADPR que actúa bloqueando la movilización del calcio inducida por cADPR, disminuye considerablemente el potencial quimiotáctico de las células dendríticas en respuesta a un variado número de quimioquinas (Partida-Sanchez et al., 2001; Partida-Sanchez et al., 2004).

Basándonos en estos datos, y con la colaboración de Partida-Sánchez que amablemente nos cedió el metabolito cADPR, quisimos comprobar si la inhibición de la activación de CD38 regula la quimiotaxis de las células dendríticas en respuesta a diferentes quimioquinas, en nuestro sistema celular *in vitro*. Para comprobar esta hipótesis, analizamos la migración de células dendríticas procedentes de progenitores de médula ósea de ratones WT maduras (LPS), tratadas con el ligando sintético GW3965, y posteriormente con el antagonista específico de cADPR, 8-Br-cADPR, para finalmente ser sometidas al gradiente de CCL19. Como se observa en la figura 24, la capacidad quimiotáctica de las células

dendríticas WT cultivadas en presencia de GW3965 disminuyó considerablemente cuando éstas fueron tratadas con el antagonista de cADPR. Esta primera aproximación en células WT corrobora la importancia de CD38 en la migración de las células dendríticas.

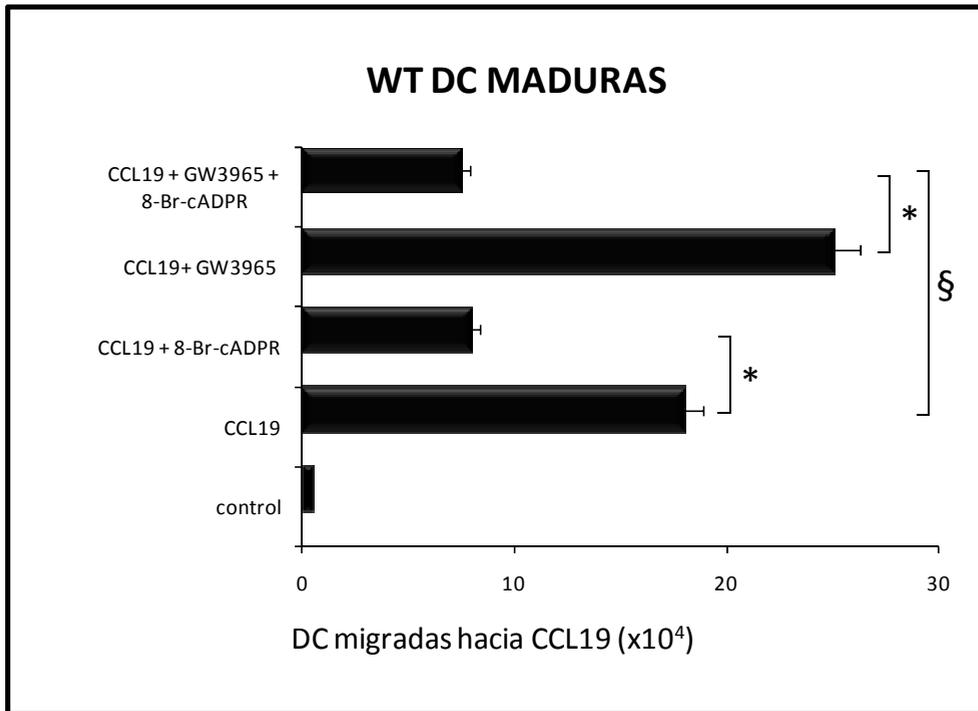


Figura 24.- Disminución de la capacidad quimiotáctica de las células dendríticas WT tratadas con el antagonista de cADPR. Células dendríticas diferenciadas con la citoquina GM-CSF a partir de progenitores de médula ósea de ratones WT, fueron sometidas a maduración con LPS, tras ser tratadas con GW3965 (1 μ M). Transcurridas 24 horas son pre-tratadas durante 15 minutos con 8-Br-cADPR, para finalmente realizar el ensayo de quimiotaxis en *transwell* frente a CCL19 durante 3 horas a 37°C. Se cuantificó el número de células migradas en respuesta a CCL19 presentes en la cámara inferior (cada condición experimental se realizó por triplicado). *: $p < 0,05$, diferencia respecto a la muestra tratada con 8-Br-cADPR. §: $p < 0,05$, diferencia respecto a la muestra tratada con GW3965.

Para profundizar en detalle en el papel que ejerce LXR en la migración de las células dendríticas a través de CD38, realizamos ensayos de quimiotaxis frente

a diferentes quimioquinas, con activación de LXR, y se completaron con el tratamiento con el antagonista de cADPR, 8-Br-cADPR, en células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$.

A pesar del incremento del índice quimiotáctico que supone la activación de LXR, el tratamiento con el antagonista de cADPR disminuyó considerablemente la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas WT, inmaduras y maduras (figura 25A y B). En las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ esta disminución no se aprecia, puesto que ya hemos observado que las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ exhiben un índice quimiotáctico muy inferior. El índice quimiotáctico de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ a nivel basal fue muy similar al observado tras la inhibición de CD38 por el antagonista 8-Br-cADPR. El análisis de células dendríticas esplénicas reveló resultados similares a los obtenidos en células derivadas de progenitores de médula ósea (figura 25C). Al analizar el efecto del antagonista de cADPR en células dendríticas maduras derivadas de bazo de ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$, se observó una disminución considerable de la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas WT de bazo.

Como hemos comprobado con los experimentos anteriores, el antagonista de cADPR conduce a una importante disminución de la capacidad quimiotáctica de células dendríticas WT de distinto origen frente a diferentes quimioquinas. Es importante señalar que el aumento de la capacidad quimiotáctica de las células dendríticas inducido por los ligandos de LXR se revierte casi completamente en las células tratadas con el inhibidor de la actividad de CD38.

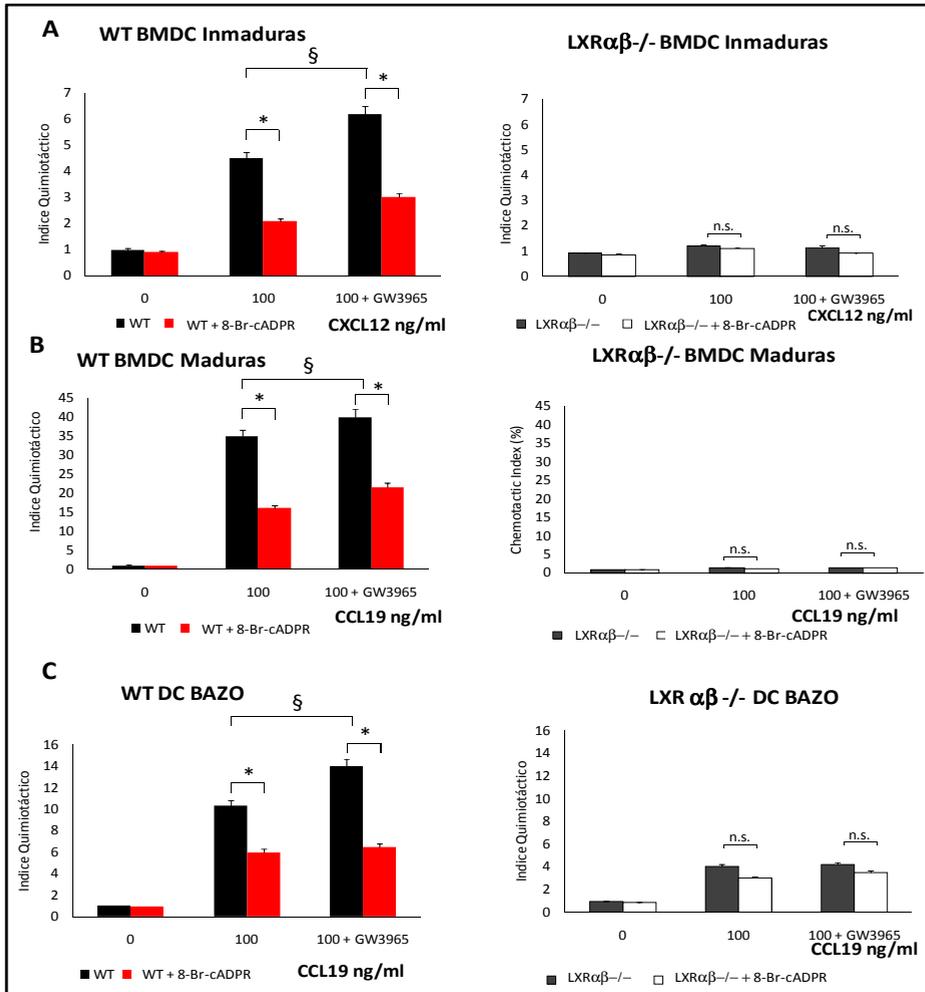


Figura 25.- Disminución del índice quimiotáctico en células dendríticas WT tras la activación de LXR, por el tratamiento con el antagonista de cADPR. Las células dendríticas obtenidas mediante la diferenciación de los progenitores de médula ósea de ratones WT y LXRαβ-/- con GM-CSF (A, inmaduras), tratadas con GW3965, activadas con LPS (24 horas) (B, maduras), y células dendríticas esplénicas (C), fueron tratadas con 8-Br-cADPR durante 15 minutos. Se sometieron a ensayo quimiotáctico en *transwell* frente a CXCL12 (A, inmaduras) y CCL19 (B, maduras) (C, esplénicas). Las células de la cámara inferior se cuantificaron y el valor se expresó como la media ± la desviación estándar del índice quimiotáctico, obtenido de tres experimentos independientes. *: p < 0,05, diferencia respecto a la muestra tratada con 8-Br-cADPR. §: p < 0,05, diferencia respecto a la muestra tratada con GW3965. n.s.; diferencia no significativa.

En el caso de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$, los resultados obtenidos revelan un comportamiento muy similar al descrito para las células dendríticas $CD38^{-/-}$ (Partida-Sanchez et al., 2004). Al igual que ocurre en dichas células, la menor capacidad de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ para migrar en respuesta a los ligandos de CCR7 y CXCR4 podría deberse a la deficiencia intrínseca de estas células para movilizar el calcio en respuesta a la unión con los receptores de quimioquinas.

Para corroborar el papel de CD38 en la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas, diseñamos un experimento de quimiotaxis con células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ como control, y empleando otros cultivos de estas células con la sobreexpresión de CD38, mediante la transfección por nucleofección específica para células dendríticas de ratón (*Amaxa[®] Mouse Dendritic Cell Nucleofector Kit*). Tras la nucleofección, las células dendríticas se mantuvieron en medio completo, y el ensayo de quimiotaxis se llevó a cabo 18 horas después de la transfección. Como se observa en la figura 26, el índice quimiotáctico de las células dendríticas WT se incrementó sensiblemente al sobreexpresar CD38 (figura 26A), respecto a las células control (GFP). Este incremento es mucho mayor en el caso de células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ transfectadas con CD38, donde el índice quimiotáctico se incrementó considerablemente tras la recuperación parcial de la expresión de CD38. Como comprobación de la eficacia de la nucleofección, se analizaron al microscopio de fluorescencia células dendríticas WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$ transfectadas con GFP. Como se aprecia en la figura 26B, la efectividad de la transfección es elevada. Este resultado indica que la alteración de la capacidad migratoria observada en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ está mediada por el defecto en la expresión de CD38 en estas células debido a la ausencia de los receptores LXR. Se refuerza la hipótesis

de la existencia de una señalización dependiente de LXR que promueve la migración de las células dendríticas, a través de la inducción de la expresión de CD38.

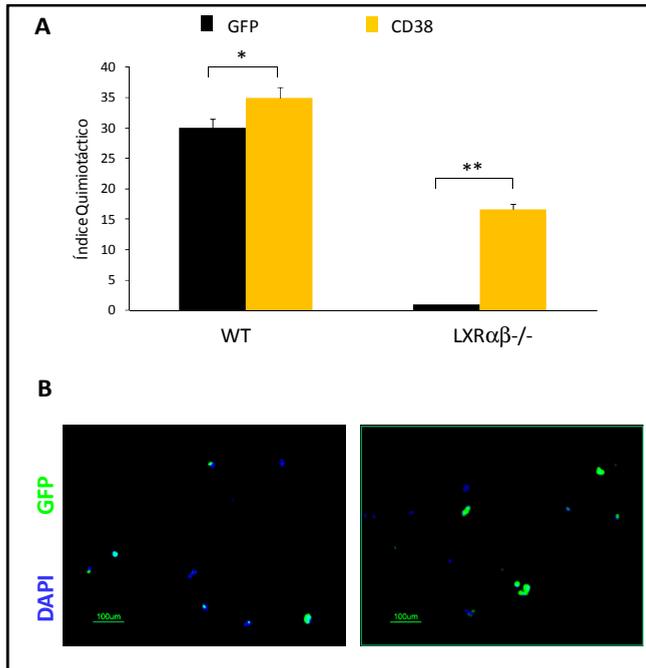


Figura 26.- Incremento de la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} en respuesta a la sobreexpresión de CD38. Se diferenciaron y maduraron células dendríticas procedentes de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, y posteriormente se transfectoron transitoriamente para CD38 y GFP como control de la transfección. (A) Se midió el índice quimiotático de estas células mediante ensayo de quimiotaxis en *transwell* (condiciones experimentales por triplicado; el experimento se realizó en tres ocasiones). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, diferencia respecto a la muestra GFP en cada genotipo. (B) Eficacia de la lipofección de las células dendríticas procedentes de la médula ósea de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} y WT. Al microscopio de fluorescencia se analizaron las células transfectadas con GFP (verde) (aumento 10x). Se utilizó el kit específico para células dendríticas de ratón de *Amamax* para transfectar las células con GFP y CD38.

DISCUSIÓN

Un aspecto clave de la biología de los receptores nucleares LXR es su capacidad para coordinar el metabolismo del colesterol y la respuesta inmune. Como sensores de colesterol, los receptores LXR juegan un papel importante en el metabolismo de ácidos biliares, la absorción intestinal y el transporte reverso de colesterol (Castrillo and Tontonoz, 2004); Repa et al., 2002; Tontonoz and Mangelsdorf, 2003), considerados, todos ellos, factores anti-aterogénicos. La demostración de que la actividad de LXR inhibe el desarrollo de aterosclerosis en ratones (Joseph et al., 2002b), junto con el incremento de la lesión observado en modelos de ratones ateroscleróticos en ausencia de los receptores LXR (Tangirala et al., 2002), pone de manifiesto el papel anti-aterogénico de estos receptores.

Al igual que en otras enfermedades inflamatorias crónicas, como la diabetes tipo 2 y desórdenes autoinmunes, el mantenimiento de la homeostasis lipídica y la implicación en la respuesta inflamatoria de los macrófagos suponen elementos clave en la respuesta inmune innata. Los receptores LXR inhiben la expresión de genes pro-inflamatorios en macrófagos activados, a través de mecanismos de trans-represión dependiente de ligando, subrayando el papel de estos receptores en la resolución de la inflamación (Joseph et al., 2003). Los receptores LXR están también implicados en la defensa frente a patógenos. La demostración de que la pérdida de función de LXR supone una susceptibilidad mayor a infecciones por *Listeria monocytogenes*, sugiere que la actividad de LXR en las células hematopoyéticas es necesaria para una correcta respuesta inmune innata frente a infecciones bacterianas (Joseph et al., 2004). Como ha quedado patente gracias a estos y otros estudios, los receptores LXR, además de su papel clave como sensores de colesterol, se encuentran altamente implicados en la modulación de la respuesta inmune innata. De este modo, a través de mecanismos de activación y represión, LXR regula diversos aspectos de la

expresión de genes inflamatorios en macrófagos. Si bien la importancia de LXR en los macrófagos se encuentra ampliamente descrita, son pocos los estudios existentes que han analizado las interacciones entre los receptores LXR y otras células del sistema inmune, como linfocitos y células dendríticas (Bensinger et al., 2008). En este sentido, recientemente se ha demostrado que la activación de linfocitos T por mitógenos se correlaciona con una menor expresión de genes implicados en el transporte de colesterol dependiente de LXR, así como en la inducción simultánea de la vía SREBP2, implicada en la síntesis de colesterol (Bensinger et al., 2008). Este hecho comporta el establecimiento de una inesperada relación entre el metabolismo de colesterol, los receptores LXR y la respuesta inmune adaptativa.

Las células dendríticas orquestan un repertorio de respuestas inmunes que conducen hacia la resistencia frente a infecciones, y hacia el silenciamiento o tolerancia inmunológica. Su comportamiento como las APC más potentes es clave como nexo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, con una implicación crucial de las mismas en procesos inflamatorios y múltiples enfermedades, como infecciones, cáncer, artritis reumatoide, y el rechazo a trasplantes (Adorini et al., 2003; Cravens and Lipsky, 2002).

La verificación de la presencia de la actividad de LXR en varias células del sistema inmune, como macrófagos o linfocitos (Bensinger and Tontonoz, 2008), sugiere que estos receptores nucleares poseen suficiente potencial para regular significativamente las funciones del sistema inmune. Considerando que la señalización mediada por LXR integra el metabolismo lipídico y algunas funciones inmunes, decidimos estudiar el papel de estos receptores en las células dendríticas. Además, está bien establecido que la exposición a diferentes lípidos,

como ácidos grasos, retinoides, o vitamina D3, es capaz de promover la generación de células dendríticas tolerogénicas tras cambios en la expresión de moléculas de superficie, producción de citoquinas y disminución de la proliferación de linfocitos T. Estos efectos se deben, en parte, a la activación de algunos miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Appel et al., 2005; Geissmann et al., 2003b; Nencioni et al., 2002; Piemonti et al., 2000; Szatmari and Nagy, 2008). En estos trabajos, se describe la capacidad que poseen las señales lipídicas para polarizar las células dendríticas hacia subtipos tolerogénicos o inmunogénicos, por lo que es factible establecer la hipótesis de una regulación de la respuesta frente a antígenos de las células dendríticas mediada por LXR.

De este modo, en un esfuerzo por investigar en detalle el papel de los receptores nucleares LXR en otros tipos celulares, en esta Tesis Doctoral hemos estudiado la actividad de LXR durante los fenómenos de diferenciación y maduración, así como la funcionalidad de las células dendríticas, mediante aproximaciones de pérdida y ganancia de función de LXR. Para ello, se llevó a cabo el análisis de las poblaciones celulares procedentes del cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/-.

La caracterización morfológica de las células dendríticas WT y LXR *knockout* no reveló diferencias significativas, así como tampoco se hallaron variaciones en la expresión de moléculas de superficie MHC-II, entre células dendríticas maduras o inmaduras de ambos genotipos. La ausencia de LXR no parece afectar al correcto establecimiento de los fenotipos inmaduro y maduro de las células dendríticas, como lo demuestra el patrón similar de expresión de moléculas co-estimuladoras, como CD80 y CD86, del marcador de activación CD69. Estas observaciones proporcionan evidencias directas para afirmar que los

progenitores de médula ósea procedentes de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ se diferencian hacia células dendríticas y maduran correctamente y de forma similar a las células dendríticas procedentes de ratones WT.

El análisis de la capacidad endocítica de las células dendríticas procedentes de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ realizado no mostró diferencias con respecto a la observada en células dendríticas WT, como reveló el estudio de captación de moléculas inertes, por lo que la ausencia de LXR parece no afectar a la capacidad de endocitosis de las células dendríticas.

Por otro lado, es importante señalar que la literatura existente hasta el momento acerca del papel de LXR en la biología de las células dendríticas es muy escasa, y se basa principalmente en el estudio de las células dendríticas derivadas de monocitos de origen humano (Geyeregger et al., 2007; Torocsik et al., 2010; Villablanca et al., 2010). Además, estos trabajos resultan algo contradictorios, ya que, mientras que uno de los trabajos describe el bloqueo de la activación de los linfocitos T tras la activación de LXR (Geyeregger et al., 2007), por otro lado se afirma que LXR induce la expresión de moléculas co-estimuladoras, incrementando la producción de citoquinas pro-inflamatorias, aumentando así la activación de los linfocitos T (Torocsik et al., 2010). Independientemente de las posibles diferencias halladas en estos trabajos, ambos comparten la noción de que $LXR\alpha$ es la isoforma predominante en las células dendríticas humanas de origen mieloide, purificadas a partir de sangre periférica. En este sentido, nuestra observación de una mayor expresión de la isoforma $LXR\alpha$ frente a la isoforma $LXR\beta$ en las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones WT está en concordancia con estos estudios previos. La descripción de una isoforma de LXR predominante en la célula

dendrítica supone una novedosa aportación al conocimiento de la biología de los receptores nucleares LXR en ratones. Las posibles implicaciones de esta expresión diferencial de LXR en las células dendríticas podrían suponer cierto valor terapéutico, favoreciendo el desarrollo de fármacos agonistas selectivos a favor de una isoforma, promoviendo o inhibiendo la actividad de LXR sobre este tipo celular. En cualquier caso, se requiere un análisis más profundo en este sentido, analizando la expresión diferencial de cada una de las isoformas de LXR y el efecto de su activación sobre las células dendríticas y su funcionalidad.

Con el objetivo de indagar en la actividad reguladora de los receptores LXR sobre las células dendríticas en nuestros modelos de ganancia y pérdida de función, se analizó el patrón de expresión de diferentes genes diana de LXR. El aumento de expresión de ABCA1, SREBP1c y otros genes diana clásicos de LXR, corroboró que LXR se encuentra transcripcionalmente activo en células dendríticas WT, coincidiendo con los datos observados por Torocsik y colaboradores en células dendríticas de origen humano (Torocsik et al., 2010).

Además, en nuestro modelo de células dendríticas LXR $\alpha\beta$ -/- pudimos comprobar que la expresión de genes implicados en el metabolismo del colesterol se encuentra disminuida basalmente, y no se modifica en presencia de ligandos sintéticos, lo que demuestra la importancia de la señalización endógena de LXR en el control transcripcional de vías metabólicas en las células dendríticas. Asimismo, pudimos apreciar que la maduración de las células dendríticas WT frente a estímulos LPS/TLR4 conlleva una sensible disminución de la expresión de estos genes, en concordancia con lo publicado anteriormente en macrófagos (Castrillo et al., 2003b). Como excepción a este fenómeno de disminución de la expresión de genes diana de LXR frente a estímulos TLR dependientes, se encuentra el gen

ABCA1, cuya expresión aumenta tras la maduración de las células dendríticas. Este hecho es debido probablemente a una regulación específica de ABCA1 en respuesta a la señal inflamatoria (Gerbod-Giannone et al., 2006). Por el contrario, la expresión de genes típicamente inflamatorios se encuentra incrementada en células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$, coincidiendo con los datos observados en macrófagos (Joseph et al., 2003; Castrillo et al., 2003b). Considerados en conjunto, nuestros resultados apuntan a que la señalización anti-inflamatoria dependiente de LXR se encuentra también activa en células dendríticas.

Como parte del estudio de las células dendríticas en el contexto de los receptores LXR, en este trabajo se comparó la disposición de este tipo celular en bazo y ganglios linfáticos en ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$. En estas localizaciones históricamente pioneras en el estudio de las células dendríticas, se empleó el marcador de fagocitos mononucleares CD11c para conocer el posicionamiento de las células dendríticas y las principales poblaciones celulares presentes en estos órganos. Nuestro análisis por inmunofluorescencia no reveló diferencias significativas en la composición celular de estos órganos linfoides secundarios entre los genotipos WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$. En este sentido, el análisis de tejidos linfoides de ratones deficientes en LXR reveló esplenomegalia dependiente de la edad (Tangirala et al., 2002), linfadenopatía y aumento del número total de células en estos órganos (Alonso-Gonzalez et al., 2009). Nuestro análisis se realizó en ratones de aproximadamente 8 semanas de edad, por lo que la ausencia de diferencias significativas observada apunta a que este defecto se trata de una hiperplasia linfoide de carácter acumulativo dependiente de la edad (a partir de 5-6 meses).

La capacidad de las células dendríticas para iniciar y orquestar la respuesta inmune es consecuencia de su localización dentro de los tejidos, su capacidad fagocítica y procesamiento de antígenos, y su elevada habilidad para migrar. Sorprendentemente, el análisis de la capacidad migratoria *in vivo* de las células dendríticas mediante un modelo experimental de sensibilización de contacto de la piel ("*FITC painting*"), reveló una presencia menor de células dendríticas en los ganglios linfáticos drenantes en ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$, en comparación con el número de células dendríticas presentes en los ganglios linfáticos de ratones WT. Esto sugiere que el tráfico de las células dendríticas de la piel hacia los ganglios linfáticos es dependiente, al menos en parte, de la regulación ejercida por LXR sobre el proceso migratorio.

Para poder llevar a cabo un análisis más profundo de la respuesta quimiotáctica dependiente de LXR en las células dendríticas, se realizó un completo estudio quimiotáctico de células dendríticas de diverso origen y en respuesta a diferentes quimioquinas *in vitro*. La respuesta quimiotáctica de las células dendríticas procedentes de ratones deficientes en LXR, en estado inmaduro y de maduración, fue significativamente inferior a la respuesta de las células dendríticas WT, independientemente del origen de las células. Estos resultados permiten postular que la actividad de LXR es importante para la correcta migración de las células dendríticas en respuesta a estímulos quimiotácticos. El defecto quimiotáctico observado en células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$, unido al aumento del índice quimiotáctico analizado en células dendríticas WT tras la activación de los receptores LXR por el ligando sintético GW3965, describen una implicación de estos receptores en la capacidad quimiotáctica de las células dendríticas.

La confirmación mediante ensayos de migración realizados *in vivo* e *in vitro* del defecto migratorio observado en los ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ supuso un hallazgo importante en nuestra investigación. Gracias a la realización de un segundo modelo de migración *in vivo* de células dendríticas, se corroboró la alteración migratoria observada en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$. La cuantificación del número de células dendríticas presentes en las áreas de linfocitos T de los ganglios linfáticos poplíteos tras la inyección, reveló la existencia de un porcentaje de células dendríticas de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ considerablemente inferior, con respecto a las células procedentes de ratones WT. De forma análoga, la migración de las células dendríticas inmaduras en respuesta a CXCL12 también resultó afectada por la ausencia de LXR, aunque en grado inferior. De este modo, LXR podría ser crítico en la regulación de la migración de diferentes subtipos de células dendríticas y/o células dendríticas en un estado de activación específico. Todos estos datos demostrando que las células dendríticas de animales $LXR\alpha\beta^{-/-}$ presentan un defecto en la capacidad migratoria, sugieren que LXR es importante para el tráfico de las células dendríticas en condiciones de homeostasis e inflamación.

La bibliografía referente a casos de defectos en la migración de las células dendríticas describe varios modelos animales que presentan alteraciones de la función migratoria de este tipo celular, por ausencia de diferentes moléculas o defectos en su función (Barbet et al., 2008; Gunn et al., 1999; Partida-Sanchez et al., 2004; Xu et al., 2001). La disminución de la migración por la ausencia de expresión del receptor CCR7 es una de las causas más estudiadas. Las células dendríticas procedentes del ratón deficiente en CCR7 presentan una reducida capacidad migratoria desde piel, lámina propia intestinal y pulmones, acompañada de una amplia desorganización de la microarquitectura de sus órganos linfoides

(Forster et al., 1999). El subtipo de células dendríticas semi-maduras ($CD11c^+MHC-II^{high}CD40^{int}CD80^{low}CD86^{low}$) está completamente ausente en los ganglios linfáticos drenantes de la piel de los ratones $CCR7^{-/-}$. Esto demuestra el papel de $CCR7$ en la migración de las células dendríticas de la piel en ausencia de señales inflamatorias, y corrobora la importancia de $CCR7$ en la inducción y mantenimiento de la tolerancia periférica (Ohl et al., 2004). Además del defecto migratorio de las células dendríticas en ausencia de $CCR7$, este modelo de ratón se caracteriza también por alteraciones en la diferenciación y maduración de timocitos, así como en defectos múltiples en la polarización y posicionamiento de los linfocitos T nativos, de memoria central y reguladores. Consecuentemente, los ratones $CCR7^{-/-}$ exhiben, por un lado, una inducción retrasada de la respuesta inmune adaptativa y, por otro, defectos en el establecimiento de la tolerancia central y periférica, así como defectos en la función de los linfocitos T reguladores (Davalos-Misslitz et al., 2007b; Hintzen et al., 2006; Li et al., 2009; Scandella et al., 2007; Schneider et al., 2007; Worbs et al., 2006). Esta tolerancia deficiente frente a antígenos propios conduce al desarrollo de la autoinmunidad multi-orgánica observada en los ratones $CCR7^{-/-}$ (Davalos-Misslitz et al., 2007a; Davalos-Misslitz et al., 2007b).

La maduración de las células dendríticas conlleva, entre otros fenómenos, el aumento de la expresión del citado receptor $CCR7$, encargado de transmitir las señales de los ligandos $CCL19$ y $CCL21$ (Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998; Sozzani et al., 1998), incrementando el tráfico de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos drenantes correspondientes. Debido a que la migración de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos requiere el receptor $CCR7$ activo (Cyster, 1999; Ohl et al., 2004), el defecto en la capacidad migratoria de nuestras células $LXR\alpha\beta^{-/-}$ podría explicarse por una alterada maduración de las mismas. Sin

embargo, el análisis de la expresión de marcadores de maduración realizado en este trabajo no reveló diferencias significativas entre células dendríticas de los genotipos WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Además, el estudio de expresión del receptor CCR7 en células dendríticas maduras procedentes de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} reveló una inducción mayor de la expresión de este receptor en células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Por ello, es probable que el defecto quimiotáctico y de migración *in vivo* observado en las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} no esté causado por un defecto en la expresión del receptor de quimioquinas CCR7.

Nuestros datos indican que la respuesta de las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} a los ligandos de CCR7 no se debe a un defecto en la maduración y correcta expresión de CCR7, sino que, probablemente, puede atribuirse a un defecto en la activación de la migración de la célula tras la señal iniciada por CCR7. Sorprendentemente, el análisis de varios componentes de la señalización que regulan la quimiotaxis dependiente de CCR7 reveló una reducción de la activación de las proteínas ERK 1/2 en células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Esto supone un importante hallazgo, al ponerse de manifiesto una posible regulación dependiente de LXR de la ruta de señalización de CCR7, a través de la activación de miembros de la familia de MAPK (Huang et al., 2003; Riol-Blanco et al., 2005). Estudios previos demuestran que la inhibición de la actividad de los miembros de la familia de MAPK, altamente implicados en la regulación de la quimiotaxis, supone un bloqueo de aproximadamente el 75% de la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas (Riol-Blanco et al., 2005). Esto subraya que la actividad de MAPK es importante para el proceso de quimiotaxis mediado por CCR7. En este sentido, un gran número de agentes inflamatorios, productos microbianos, factores de crecimiento y citoquinas promueven la maduración de la célula dendrítica y la

inducción de CCR7 (Banchereau et al., 2000), pero los mecanismos que regulan directamente la expresión de CCR7 no se conocen todavía en detalle.

Todo ello sugiere que la actividad de CCR7 en el contexto de la quimiotaxis es un proceso complejo, y tal vez existen moléculas adicionales sin identificar que podrían estar regulando parcialmente este proceso. Son varios los estudios que apuntan a la necesidad de otras señales que permitan la correcta activación de la actividad de CCR7, sugiriendo que algunas de estas señales podrían ser mediadores lipídicos (Del Prete et al., 2007). Con los resultados presentados en este trabajo, planteamos una posible conexión entre los receptores LXR y CCR7, siendo necesaria la expresión de LXR para la correcta migración dirigida por CCR7. Obviamente, son necesarios estudios adicionales para determinar los mecanismos que subyacen en la relación entre la actividad de LXR, la expresión de moléculas reguladoras de la quimiotaxis y las características fenotípicas de las células dendríticas maduras.

La migración dependiente de CCR7 ha adquirido recientemente especial importancia en el fenómeno de regresión de la placa aterosclerótica. Trabajos recientes, que han sido publicados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral (Trojan et al., 2006), apuntan hacia un mecanismo adicional de ateroprotección de LXR, basado en la estimulación de la migración celular desde las placas ateroscleróticas a través de la maduración inducida por CCR7. Estos estudios han demostrado un aumento de expresión de este receptor en un modelo de regresión de la placa, siendo necesaria la función de CCR7 para el descenso del contenido de células espumosas en la misma (Trojan et al., 2006). Evidencias muy recientes apuntan al requerimiento de LXR para la máxima expresión de CCR7 en células CD68⁺ presentes en la placa aterosclerótica (Feig et al., 2010). En este estudio, los

autores muestran cómo el tratamiento *in vitro* con agonistas de LXR incrementa la expresión génica y la funcionalidad de CCR7 en una línea celular murina de células dendríticas inmaduras, así como en células dendríticas humanas inmaduras. Este resultado propone un mecanismo adicional que contribuye a la ateroprotección ejercida por LXR, a través de su estimulación de la emigración de células CD68⁺ desde la placa, mediante la inducción de CCR7.

En este sentido es importante comentar la actual controversia que existe en la nomenclatura y los marcadores que diferencian a macrófagos y células dendríticas. En este caso en concreto (Feig et al., 2010), los autores del trabajo explican que estas células CD68⁺, marcador estándar de macrófagos y células espumosas (Waldo et al., 2008), podrían ser células dendríticas o macrófagos. Esta confusión existe principalmente entre células dendríticas y macrófagos en órganos no linfoides, debido a la escasa caracterización que existe de estas células en comparación con las células pertenecientes a los tejidos linfoides, por lo que se trata de un tema que sigue en continuo debate (Geissmann et al., 2010a). Feig y colaboradores muestran como la inducción de CCR7 dependiente de LXR no se observa en células dendríticas humanas maduras, en las que la activación de LXR produjo una supresión de la expresión de CCR7 (Feig et al., 2010). Este resultado está en concordancia con otro estudio reciente en el que se demuestra que los ligandos de LXR producidos por células tumorales inhiben la expresión de CCR7 en células dendríticas maduras, sin alterar las propiedades inmuno-estimuladoras de las células (Villablanca et al., 2010). Sin embargo, estas observaciones se encuentran en discrepancia con estudios previos (Gabrilovich, 2004); (Geyeregger et al., 2007), en los que se muestra el defecto de otras funciones inmuno-estimuladoras de las células dendríticas tras la activación de LXR con ligandos sintéticos. Estas diferencias podrían ser debidas a la existencia de variaciones en

las condiciones experimentales en los diferentes cultivos celulares. Por lo tanto, las diferencias con los estudios anteriores requieren de un análisis más profundo, que permitan definir con precisión el mecanismo de acción de los receptores LXR en la biología de las células dendríticas.

Nuestro análisis de genoma completo con microarrays reveló que la expresión de genes típicamente asociados a la activación y maduración de las células dendríticas, no se encontraba significativamente afectada por la ausencia de LXR. Estos datos concuerdan con nuestros resultados anteriores, en los que no apreciamos diferencias significativas en la activación de las células dendríticas carentes de LXR. Pero además, parte de nuestro trabajo se ha centrado en realizar un estudio más profundo de estos microarrays, que permita identificar posibles genes diana de LXR implicados en la biología de las células dendríticas.

Fruto del estudio donde se analizó el efecto de la activación de LXR en células dendríticas WT, se halló una inducción significativa de la expresión del gen CD38. La ectoenzima CD38 está implicada en la regulación de la migración de los leucocitos hacia diferentes quimioatrayentes; así, las células dendríticas procedentes de ratones deficientes en CD38 presentan un defecto intrínseco en su respuesta quimiotáctica (Partida-Sanchez et al., 2004). Con objeto de confirmar si esta inducción en la expresión de CD38 se debía a una regulación dependiente de LXR, se analizó la expresión de CD38 en células dendríticas WT y LXR $\alpha\beta$ ⁻/⁻. En todos los casos, se observó una menor expresión de CD38, tanto en ARNm como en proteína, en las células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ⁻/⁻ con respecto a WT. Esto revela una posible implicación de los receptores LXR en la regulación de la expresión de CD38. El patrón de expresión de CD38 en respuesta a los ligandos sintéticos se asemeja al patrón de expresión de los genes diana de LXR. Además, la inducción de la

expresión génica de CD38 tras la maduración de la célula dendrítica, resultó ser significativamente mayor en células WT, con respecto a las células procedentes de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Estos datos identifican a CD38 como nuevo gen diana directo de LXR, regulado mediante mecanismos de trans-activación dependiente de ligando.

La observación de que LXR interviene en la regulación de la expresión de CD38 promovió el análisis de los efectos de la activación de estos receptores en los que se bloqueó la acción de CD38. Mediante ensayos de quimiotaxis, en los que se inhibió la acción de CD38 por una molécula competidora de cADPR, se corroboró la implicación de esta molécula en el fenómeno migratorio, como ya había sido descrito anteriormente (Partida-Sanchez et al., 2001; Partida-Sanchez et al., 2004). De este modo, tras el tratamiento de células dendríticas WT con el antagonista de cADPR se apreció una considerable reducción del índice quimiotáctico. La disminución de la respuesta quimiotáctica observada en las células dendríticas WT tras la activación de LXR en presencia del inhibidor de la acción de CD38, sugiere que el efecto pro-migratorio ejercido por los agonistas de LXR en las células dendríticas WT es parcialmente mediado por la expresión de CD38. Este fenómeno se apreció en células dendríticas WT independientemente de su origen y estado de activación, y en todos los casos la inducción que LXR produjo sobre la quimiotaxis se vio parcialmente mermada por la inhibición de la actividad de CD38. Es importante resaltar que la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ tratadas con el antagonista de CD38 prácticamente no se vio alterada. De este modo, comprobamos la implicación de CD38 en el evento migratorio, y la posibilidad de que exista una inter-relación entre esta ectoenzima encargada de la movilización de calcio y la acción de los receptores nucleares LXR en el contexto de la migración de las células dendríticas.

Mediante ensayos de ganancia de función a través de la transfección de CD38 en células dendríticas LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, logramos promover la quimiotaxis de estas células en respuesta a diferentes quimioquinas, con una recuperación parcial del índice quimiotáctico. La expresión ectópica de CD38 en células WT también incrementó parcialmente su porcentaje quimiotáctico. Estos resultados muestran que la actividad de LXR promueve la migración de las células dendríticas, al menos en parte, a través de la inducción de la expresión de CD38. De este modo, estos datos demuestran que la reducción de la migración de las células dendríticas en ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} se correlaciona con una menor expresión de genes involucrados en este fenómeno, como CD38, lo que apoya la hipótesis de que LXR participa en la regulación del evento migratorio de las células dendríticas.

Por tanto, la trascendencia de los receptores LXR en el fenómeno migratorio es amplia ya que, basándonos en los datos presentados en este trabajo, estarían implicados en distintos niveles del proceso. Por un lado, los receptores LXR están involucrados en la correcta migración de las células dendríticas frente a diferentes estímulos quimiotácticos. Además, la implicación de LXR en la correcta activación de miembros de la familia de las MAPK atribuye un papel a estos receptores en las vías de señalización quimiotácticas reguladas por CCR7. Por último, la descripción de CD38 como gen diana de LXR demuestra la importancia de estos receptores en el proceso migratorio. Tomados en conjunto, estos datos describen por primera vez la implicación de LXR en el contexto de la inmunidad como reguladores de la migración de las células dendríticas, constituyendo una vía novedosa, que aporta nuevos datos sobre el papel de estos receptores en la modulación del sistema inmune.

En resumen, los resultados expuestos en este trabajo aportan nuevos conocimientos que permiten avanzar, un paso más, en el entendimiento de la relevancia del papel de estos receptores nucleares en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, así como en la respuesta inmune frente a antígenos propios o extraños. Estos resultados, junto con los datos existentes en la bibliografía y descritos por nuestro laboratorio, realzan la importancia de los receptores nucleares LXR en procesos cruciales en el organismo como el metabolismo de los lípidos, procesos inflamatorios, retirada de restos celulares, mantenimiento de la tolerancia inmunológica y desarrollo de la respuesta inmune adaptativa.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en este trabajo son:

1. Los progenitores de médula ósea procedente de ratones $LXR\alpha\beta^{-/-}$ presentan un proceso de diferenciación hacia células dendríticas similar a las células procedentes de ratones WT. La ausencia de LXR no parece impedir el correcto establecimiento de los fenotipos inmaduro y maduro de las células dendríticas.
2. Los receptores LXR se encuentran transcripcionalmente activos en las células dendríticas de origen murino, con un patrón de expresión de los genes diana de LXR similar al observado en otras células de origen mieloide. La señalización anti-inflamatoria dependiente de LXR se encuentra también activa en las células dendríticas.
3. La distribución de las principales poblaciones celulares de los órganos linfoides secundarios es semejante en ratones WT y $LXR\alpha\beta^{-/-}$. Tampoco la capacidad endocítica de las células dendríticas de ratón se encuentra afectada por la ausencia/defecto de expresión de estos receptores, ya que no se han observado diferencias en la capacidad para captar antígenos entre las células dendríticas de ambos genotipos.
4. La actividad de LXR es necesaria para la correcta migración de las células dendríticas bajo condiciones inflamatorias. El tráfico de las células dendríticas desde la piel hacia los ganglios linfáticos, así como en respuesta a diferentes estímulos quimiotácticos, es dependiente, al menos en parte, de la regulación ejercida por LXR sobre el proceso migratorio.

5. El defecto migratorio observado en las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ no es debido a un defecto en la expresión del receptor de quimioquinas CCR7. Sin embargo, los resultados indican que los receptores LXR participan en la regulación de las vías quimiotácticas que a su vez son controladas por CCR7, como los miembros de la familia de MAP quinasas.

6. El análisis global de la expresión de genes en células dendríticas, en ausencia de sobreactivación de LXR, indica una regulación de la expresión del gen CD38 dependiente de los receptores LXR. El estudio detallado de la regulación transcripcional de CD38 lo identifica como nuevo gen diana directo de LXR.

7. La inhibición del mecanismo efector de CD38 a través del tratamiento con el antagonista de cADPR (8-Br-cADPR) reduce la respuesta quimiotáctica de las células dendríticas WT. Además, las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ presentan una recuperación parcial del índice quimiotáctico tras la sobreexpresión de CD38. Los resultados indican que la reducida capacidad migratoria de las células dendríticas $LXR\alpha\beta^{-/-}$ se correlaciona con la menor expresión de CD38. Los receptores LXR intervienen en el proceso migratorio de las células dendríticas, al menos en parte, a través de la regulación de la expresión de CD38.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M., and Thomson, A.W. (2003). Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells. *Transpl Immunol* *11*, 357-365.
- Adorini, L., Penna, G., Giarratana, N., and Uskokovic, M. (2003). Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem* *88*, 227-233.
- Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* *185*, 111-120.
- Alonso-Gonzalez, N., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Diaz, M., Gallardo, G., *et al.* (2009). Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* *31*, 245-258.
- Alvarez, D., Vollmann, E.H., and von Andrian, U.H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* *29*, 325-342.
- Anderson, A.O., and Anderson, N.D. (1975). Studies on the structure and permeability of the microvasculature in normal rat lymph nodes. *The American journal of pathology* *80*, 387-418.
- Angeli, V., Hammad, H., Staels, B., Capron, M., Lambrecht, B.N., and Trottein, F. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration of dendritic cells: consequences for the immune response. *J Immunol* *170*, 5295-5301.
- Angeli, V., Llodra, J., Rong, J.X., Satoh, K., Ishii, S., Shimizu, T., Fisher, E.A., and Randolph, G.J. (2004a). Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity* *21*, 561-574.
- Angeli, V., Staumont, D., Charbonnier, A.S., Hammad, H., Gosset, P., Pichavant, M., Lambrecht, B.N., Capron, M., Dombrowicz, D., and Trottein, F. (2004b). Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol* *172*, 3822-3829.
- Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G., and Pfahl, M. (1994). A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol* *14*, 7025-7035.
- Appel, S., Mirakaj, V., Bringmann, A., Weck, M.M., Grunebach, F., and Brossart, P. (2005). PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood* *106*, 3888-3894.
- Ardavin, C. (1997). Thymic dendritic cells. *Immunol Today* *18*, 350-361.

- Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., *et al.* (2009a). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206, 595-606.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009b). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.
- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmsberg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270, 286-290.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Barbet, G., Demion, M., Moura, I.C., Serafini, N., Leger, T., Vrtovsnik, F., Monteiro, R.C., Guinamard, R., Kinet, J.P., and Launay, P. (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.
- Barish, G.D., Downes, M., Alaynick, W.A., Yu, R.T., Ocampo, C.B., Bookout, A.L., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (2005). A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol* 19, 2466-2477.
- Barnes, P.J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94, 557-572.
- Bauvois, B., Durant, L., Laboureaux, J., Barthelemy, E., Rouillard, D., Boulla, G., and Deterre, P. (1999). Upregulation of CD38 gene expression in leukemic B cells by interferon types I and II. *J Interferon Cytokine Res* 19, 1059-1066.
- Bedford, P.A., and Knight, S.C. (1989). The effect of retinoids on dendritic cell function. *Clin Exp Immunol* 75, 481-486.
- Bell, D., Young, J.W., and Banchereau, J. (1999). Dendritic cells. *Adv Immunol* 72, 255-324.
- Belz, G.T., Wilson, N.S., Smith, C.M., Mount, A.M., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2006). Bone marrow-derived cells expand memory CD8+ T cells in response to viral infections of the lung and skin. *Eur J Immunol* 36, 327-335.
- Bensinger, S.J., Bradley, M.N., Joseph, S.B., Zelcer, N., Janssen, E.M., Hausner, M.A., Shih, R., Parks, J.S., Edwards, P.A., Jamieson, B.D., and Tontonoz, P. (2008). LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 134, 97-111.

- Bensinger S.J., Tontonoz P., (2008) Integration of metabolism and inflammation by lipid- activated nuclear receptors. *Nature* 454, 470–477.
- Berge, K.E., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Guerra, R., Grundy, S.M., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2002). Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 43, 486-494.
- Berger, T.G., and Schultz, E.S. (2003). Dendritic cell-based immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 276, 163-197.
- Berlin, R.D., and Oliver, J.M. (1980). Surface functions during mitosis. II. Quantitation of pinocytosis and kinetic characterization of the mitotic cycle with a new fluorescence technique. *J Cell Biol* 85, 660-671.
- Bobryshev, Y.V., and Lord, R.S. (1995). Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol* 58, 307-322.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., *et al.* (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.
- Bonasio, R., Scimone, M.L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A.H., and von Andrian, U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nature immunology* 7, 1092-1100.
- Bonasio, R., and von Andrian, U.H. (2006). Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 18, 503-511.
- Bouchon, A., Hernandez-Munain, C., Cella, M., and Colonna, M. (2001). A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1111-1122.
- Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. (2000). Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13, 829-840.
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L., and Maliszewski, C.R. (2000). Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96, 3029-3039.
- Bursch, L.S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D.H., and Hogquist, K.A. (2007). Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med* 204, 3147-3156.
- Cao, G., Liang, Y., Broderick, C.L., Oldham, B.A., Beyer, T.P., Schmidt, R.J., Zhang, Y., Stayrook, K.R., Suen, C., Otto, K.A., *et al.* (2003). Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 278, 1131-1136.

- Cao, W., Tan, P., Lee, C.H., Zhang, H., and Lu, J. (2006). A transforming growth factor-beta-induced protein stimulates endocytosis and is up-regulated in immature dendritic cells. *Blood* *107*, 2777-2785.
- Carlsen, H.S., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P., and Baekkevold, E.S. (2005). Disparate lymphoid chemokine expression in mice and men: no evidence of CCL21 synthesis by human high endothelial venules. *Blood* *106*, 444-446.
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Marathe, C., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2003a). Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* *278*, 10443-10449.
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Vaidya, S.A., Haberland, M., Fogelman, A.M., Cheng, G., and Tontonoz, P. (2003b). Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* *12*, 805-816.
- Castrillo, A., and Tontonoz, P. (2004). Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol* *20*, 455-480.
- Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M.C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., and Vicari, A. (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* *22*, 345-369.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* *360*, 258-261.
- Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Mazo, I.B., Halin, C., Cheng, G., van der Velden, A.W., Cariappa, A., Chase, C., Russell, P., Starnbach, M.N., *et al.* (2005). Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* *6*, 1029-1037.
- Cebon, J., Layton, J.E., Maher, D., and Morstyn, G. (1994). Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br J Haematol* *86*, 265-274.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999). Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* *5*, 919-923.
- Cervantes-Barragan, L., Zust, R., Weber, F., Spiegel, M., Lang, K.S., Akira, S., Thiel, V., and Ludewig, B. (2007). Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood* *109*, 1131-1137.

- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., Jr., and Cyster, J.G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature immunology* *9*, 54-62.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* *5*, 1219-1226.
- Collins, J.L., Fivush, A.M., Watson, M.A., Galardi, C.M., Lewis, M.C., Moore, L.B., Parks, D.J., Wilson, J.G., Tippin, T.K., Binz, J.G., *et al.* (2002). Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* *45*, 1963-1966.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* *275*, 28240-28245.
- Cravens, P.D., and Lipsky, P.E. (2002). Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunology and cell biology* *80*, 497-505.
- Crow, M.K. (2006). Modification of accessory molecule signaling. *Springer Semin Immunopathol* *27*, 409-424.
- Curtiss, L.K., and Boisvert, W.A. (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* *11*, 243-251.
- Cyster, J.G. (1999). Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* *286*, 2098-2102.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* *294*, 1866-1870.
- Cheers, C., Haigh, A.M., Kelso, A., Metcalf, D., Stanley, E.R., and Young, A.M. (1988). Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect Immun* *56*, 247-251.
- Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* *377*, 454-457.
- Chen, Z., Dehm, S., Bonham, K., Kamencic, H., Juurlink, B., Zhang, X., Gordon, J.R., and Xiang, J. (2001). DNA array and biological characterization of the impact of the maturation status of mouse dendritic cells on their phenotype and antitumor vaccination efficacy. *Cell Immunol* *214*, 60-71.
- Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., *et al.* (2003). Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *Journal of immunology* *171*, 4552-4560.
- Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K.J., Chambon, P., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Barbaroux, J.B., Groves, R., and Geissmann, F. (2009).

- Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med* 206, 3089-3100.
- Dai, X.M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111-120.
- Dalen, K.T., Ulven, S.M., Bamberg, K., Gustafsson, J.A., and Nebb, H.I. (2003). Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem* 278, 48283-48291.
- Davalos-Miszlitz, A.C., Rieckenberg, J., Willenzon, S., Worbs, T., Kremmer, E., Bernhardt, G., and Forster, R. (2007a). Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *Eur J Immunol* 37, 613-622.
- Davalos-Miszlitz, A.C., Worbs, T., Willenzon, S., Bernhardt, G., and Forster, R. (2007b). Impaired responsiveness to T-cell receptor stimulation and defective negative selection of thymocytes in CCR7-deficient mice. *Blood* 110, 4351-4359.
- Del Prete, A., Shao, W.H., Mitola, S., Santoro, G., Sozzani, S., and Haribabu, B. (2007). Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B4 receptors: a role for LTB4 in up-regulation of CCR7 expression and function. *Blood* 109, 626-631.
- Diacovo, T.G., Blasius, A.L., Mak, T.W., Cella, M., and Colonna, M. (2005). Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. *J Exp Med* 202, 687-696.
- Dieu, M.C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J.M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373-386.
- Ding, X.F., Anderson, C.M., Ma, H., Hong, H., Uht, R.M., Kushner, P.J., and Stallcup, M.R. (1998). Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol* 12, 302-313.
- Drinker, C.K., Field, M.E., and Ward, H.K. (1934). The Filtering Capacity of Lymph Nodes. *The Journal of experimental medicine* 59, 393-405.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.

- Fanger, N.A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T.F., and Guyre, P.M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* *157*, 541-548.
- Farina, C., Theil, D., Semlinger, B., Hohlfeld, R., and Meinl, E. (2004). Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol* *16*, 799-809.
- Faveeuw, C., Fougeray, S., Angeli, V., Fontaine, J., Chinetti, G., Gosset, P., Delerive, P., Maliszewski, C., Capron, M., Staels, B., *et al.* (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett* *486*, 261-266.
- Fazekas de St Groth, B. (2001). DCs and peripheral T cell tolerance. *Seminars in immunology* *13*, 311-322.
- Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* *272*, 50-53.
- Feig, J.E., Pineda-Torra, I., Sanson, M., Bradley, M.N., Vengrenyuk, Y., Bogunovic, D., Gautier, E.L., Rubinstein, D., Hong, C., Liu, J., *et al.* (2010) LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. *J Clin Invest* *120*, 4415-4424.
- Fernandez, J.E., Deaglio, S., Donati, D., Beusan, I.S., Corno, F., Aranega, A., Forni, M., Falini, B., and Malavasi, F. (1998). Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues. *J Biol Regul Homeost Agents* *12*, 81-91.
- Fliegert, R., Gasser, A., and Guse, A.H. (2007). Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem Soc Trans* *35*, 109-114.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* *311*, 83-87.
- Fonfria, E., Murdock, P.R., Cusdin, F.S., Benham, C.D., Kelsell, R.E., and McNulty, S. (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* *26*, 159-178.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* *99*, 23-33.
- Fowler, A.J., Sheu, M.Y., Schmuth, M., Kao, J., Fluhr, J.W., Rhein, L., Collins, J.L., Willson, T.M., Mangelsdorf, D.J., Elias, P.M., and Feingold, K.R. (2003). Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J Invest Dermatol* *120*, 246-255.

- Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A.J., and Steinman, R.M. (2004). The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* *199*, 1607-1618.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* *4*, 941-952.
- Galgani, M., De Rosa, V., De Simone, S., Leonardi, A., D'Oro, U., Napolitani, G., Masci, A.M., Zappacosta, S., and Racioppi, L. (2004). Cyclic AMP modulates the functional plasticity of immature dendritic cells by inhibiting Src-like kinases through protein kinase A-mediated signaling. *J Biol Chem* *279*, 32507-32514.
- Geissmann, F., Gordon, S., Hume, D.A., Mowat, A.M., and Randolph, G.J. (2010a) Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat Rev Immunol* *10*, 453-460.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003a). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71-82.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010b) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656-661.
- Geissmann, F., Revy, P., Brousse, N., Lepelletier, Y., Folli, C., Durandy, A., Chambon, P., and Dy, M. (2003b). Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med* *198*, 623-634.
- Gerbod-Giannone, M.C., Li, Y., Holleboom, A., Han, S., Hsu, L.C., Tabas, I., and Tall, A.R. (2006). TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3112-3117.
- Geyeregger, R., Zeyda, M., Bauer, W., Kriehuber, E., Saemann, M.D., Zlabinger, G.J., Maurer, D., and Stulnig, T.M. (2007). Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* *109*, 4288-4295.
- Ginhoux, F., Collin, M.P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., Ochando, J., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Grisotto, M., *et al.* (2007). Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* *204*, 3133-3146.
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubreau, M., Dai, X.M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., and Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* *7*, 265-273.
- Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* *15*, 391-407.

- Glass, C.K. (2006). Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest* *116*, 556-560.
- Glass, C.K., and Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* *6*, 44-55.
- Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* *14*, 121-141.
- Gosset, P., Charbonnier, A.S., Delerive, P., Fontaine, J., Staelens, B., Pestel, J., Tonnel, A.B., and Trottein, F. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* *31*, 2857-2865.
- Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* *185*, 1101-1111.
- Guenther, M.G., Lane, W.S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M.A., and Shiekhattar, R. (2000). A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev* *14*, 1048-1057.
- Guerrero-Plata, A., Casola, A., Suarez, G., Yu, X., Spetch, L., Peeples, M.E., and Garofalo, R.P. (2006). Differential response of dendritic cells to human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* *34*, 320-329.
- Gunn, M.D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L.T., and Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* *189*, 451-460.
- Hackstein, H., and Thomson, A.W. (2004). Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* *4*, 24-34.
- Hammad, H., de Heer, H.J., Soullie, T., Angeli, V., Trottein, F., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol* *164*, 263-271.
- Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2007). Lung dendritic cell migration. *Adv Immunol* *93*, 265-278.
- Hartiala, P., Hytonen, J., Pelkonen, J., Kimppa, K., West, A., Penttinen, M.A., Suhonen, J., Laheesmaa, R., and Viljanen, M.K. (2007). Transcriptional response of human dendritic cells to *Borrelia garinii*--defective CD38 and CCR7 expression detected. *J Leukoc Biol* *82*, 33-43.
- Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., and Villadangos, J.A. (2004).

- Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199, 9-26.
- Hecht, A., and Grunstein, M. (1999). Mapping DNA interaction sites of chromosomal proteins using immunoprecipitation and polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 304, 399-414.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.
- Hemmi, H., and Akira, S. (2005). TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy* 86, 120-135.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 167, 741-748.
- Hintzen, G., Ohl, L., del Rio, M.L., Rodriguez-Barbosa, J.I., Pabst, O., Kocks, J.R., Krege, J., Hardtke, S., and Forster, R. (2006). Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 177, 7346-7354.
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., and O'Keeffe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 166, 5448-5455.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., and et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109, 1125-1131.
- Howard, M., Grimaldi, J.C., Bazan, J.F., Lund, F.E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R.M., Walseth, T.F., and Lee, H.C. (1993). Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262, 1056-1059.
- Hu, X., and Lazar, M.A. (1999). The CoNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93-96.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., and Hacohen, N. (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294, 870-875.

- Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M.D., and Jacobson, K. (2003). JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* 424, 219-223.
- Iijima, N., Yanagawa, Y., Clingan, J.M., and Onoe, K. (2005). CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int Immunol* 17, 1201-1212.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R. M., Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176, 1693-1702
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* 176, 1693-1702.
- Iqbal, J., and Zaidi, M. (2007). CD38 is required for priming by TNF-alpha: a mechanism for extracellular coordination of cell fate. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F1283-1290.
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., and Agace, W.W. (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205, 2139-2149.
- Jang, M.H., Sougawa, N., Tanaka, T., Hirata, T., Hiroi, T., Tohya, K., Guo, Z., Umemoto, E., Ebisuno, Y., Yang, B.G., *et al.* (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* 176, 803-810.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728-731.
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R., and Agace, W.W. (2005). Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 202, 1063-1073.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Steinbrink, K., and Enk, A.H. (2001). Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends in immunology* 22, 394-400.
- Joseph, S.B., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bruhn, K.W., Mak, P.A., Pei, L., Hogenesch, J., O'Connell R, M., Cheng, G., Saez, E., *et al.* (2004). LXR-dependent gene

- expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* **119**, 299-309.
- Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* **9**, 213-219.
- Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., and Tontonoz, P. (2002a). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* **277**, 11019-11025.
- Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., *et al.* (2002b). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7604-7609.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* **20**, 4106-4114.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211-220.
- Junt, T., Moseman, E.A., Iannaccone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., *et al.* (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* **450**, 110-114.
- Katakai, T., Hara, T., Lee, J.H., Gonda, H., Sugai, M., and Shimizu, A. (2004). A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol* **16**, 1133-1142.
- Katakai, T., Suto, H., Sugai, M., Gonda, H., Togawa, A., Suematsu, S., Ebisuno, Y., Katagiri, K., Kinashi, T., and Shimizu, A. (2008). Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *Journal of immunology* **181**, 6189-6200.
- Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P.A. (2001). Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* **276**, 39438-39447.
- Khader, S.A., Partida-Sanchez, S., Bell, G., Jelley-Gibbs, D.M., Swain, S., Pearl, J.E., Ghilardi, N., Desauvage, F.J., Lund, F.E., and Cooper, A.M. (2006).

- Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 203, 1805-1815.
- Kim, C.H. (2005). The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr Opin Hematol* 12, 298-304.
- Kitanaka, N., Owada, Y., Okuyama, R., Sakagami, H., Nourani, M.R., Aiba, S., Furukawa, H., Watanabe, M., Ono, M., Ohteki, T., and Kondo, H. (2006). Epidermal-type fatty acid binding protein as a negative regulator of IL-12 production in dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 459-466.
- Klareskog, L., Tjernlund, U., Forsum, U., and Peterson, P.A. (1977). Epidermal Langerhans cells express Ia antigens. *Nature* 268, 248-250.
- Klotz, L., Dani, I., Edenhofer, F., Nolden, L., Evert, B., Paul, B., Kolanus, W., Klockgether, T., Knolle, P., and Diehl, L. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma control of dendritic cell function contributes to development of CD4+ T cell anergy. *J Immunol* 178, 2122-2131.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420, 1-16.
- Kurobe, H., Liu, C., Ueno, T., Saito, F., Ohigashi, I., Seach, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Kitagawa, T., Lipp, M., *et al.* (2006). CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 24, 165-177.
- Laffitte, B.A., Chao, L.C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S.B., Castrillo, A., Wilpitz, D.C., Mangelsdorf, D.J., Collins, J.L., *et al.* (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5419-5424.
- Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 507-512.
- Lambrecht, B.N., Salomon, B., Klatzmann, D., and Pauwels, R.A. (1998). Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* 160, 4090-4097.
- Langerhans, P (1868). «Ueber die Nervender menschlicher» (en German). *Haut. Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 44: pp. 325.
- Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.Y., and Flavell, R.A. (2003). STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 19, 903-912.
- Le Naour, F., Hohenkirk, L., Grolleau, A., Misek, D.E., Lescure, P., Geiger, J.D., Hanash, S., and Beretta, L. (2001). Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells

- using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 276, 17920-17931.
- Lee, H.C., and Aarhus, R. (1995). A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 270, 2152-2157.
- Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 308, 512-517.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., and Willson, T.M. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272, 3137-3140.
- Levin, N., Bischoff, E.D., Daige, C.L., Thomas, D., Vu, C.T., Heyman, R.A., Tangirala, R.K., and Schulman, I.G. (2005). Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 135-142.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 7, 678-689.
- Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* 206, 607-622.
- Li, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J., and Wong, J. (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J* 19, 4342-4350.
- Lindner, I., Cejas, P.J., Carlson, L.M., Torruellas, J., Plano, G.V., and Lee, K.P. (2007). Signal transduction in DC differentiation: winged messengers and Achilles' heel. *Adv Exp Med Biol* 590, 1-29.
- Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 8, 1255-1265.
- Liu, K., Victora, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392-397.
- Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.
- Lund, F.E. (2006). Signaling properties of CD38 in the mouse immune system: enzyme-dependent and -independent roles in immunity. *Mol Med* 12, 328-333.

- Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., and Cyster, J.G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt* mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 12694-12699.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* *223*, 77-92.
- Lyman, S.D., and Jacobsen, S.E. (1998). *c-kit* ligand and *Flt3* ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* *91*, 1101-1134.
- Macatonia, S.E., Knight, S.C., Edwards, A.J., Griffiths, S., and Fryer, P. (1987). Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med* *166*, 1654-1667.
- Malavasi, F., Funaro, A., Alessio, M., DeMonte, L.B., Ausiello, C.M., Dianzani, U., Lanza, F., Magrini, E., Momo, M., and Roggero, S. (1992). CD38: a multi-lineage cell activation molecule with a split personality. *Int J Clin Lab Res* *22*, 73-80.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* *83*, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* *83*, 835-839.
- Mantovani, A., Allavena, P., Vecchi, A., and Sozzani, S. (1998). Regulation of chemokine receptor expression in dendritic cells. *Research in immunology* *149*, 639-641.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., and McKenna, H.J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in *Flt3* ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* *184*, 1953-1962.
- Maraskovsky, E., Daro, E., Roux, E., Teepe, M., Maliszewski, C.R., Hoek, J., Caron, D., Lebsack, M.E., and McKenna, H.J. (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by *Flt3* ligand. *Blood* *96*, 878-884.
- Marsland, B.J., Battig, P., Bauer, M., Ruedl, C., Lassing, U., Beerli, R.R., Dietmeier, K., Ivanova, L., Pfister, T., Vogt, L., *et al.* (2005). CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* *22*, 493-505.
- Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U.E., Ugucioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell

- migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* *198*, 615-621.
- Massberg, S., Schaerli, P., Knezevic-Maramica, I., Kollnberger, M., Tubo, N., Moseman, E.A., Huff, I.V., Junt, T., Wagers, A.J., Mazo, I.B., and von Andrian, U.H. (2007). Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* *131*, 994-1008.
- Massullo, P., Sumoza-Toledo, A., Bhagat, H., and Partida-Sanchez, S. (2006). TRPM channels, calcium and redox sensors during innate immune responses. *Semin Cell Dev Biol* *17*, 654-666.
- McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., *et al.* (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* *95*, 3489-3497.
- McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2002). Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* *143*, 2461-2465.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* *5*, 606-616.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* *427*, 154-159.
- Merkenschlager, M., Power, M.O., Pircher, H., and Fisher, A.G. (1999). Intrathymic deletion of MHC class I-restricted cytotoxic T cell precursors by constitutive cross-presentation of exogenous antigen. *European journal of immunology* *29*, 1477-1486.
- Metlay, J.P., Witmer-Pack, M.D., Agger, R., Crowley, M.T., Lawless, D., and Steinman, R.M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* *171*, 1753-1771.
- Meunier, L., Bohjanen, K., Voorhees, J.J., and Cooper, K.D. (1994). Retinoic acid upregulates human Langerhans cell antigen presentation and surface expression of HLA-DR and CD11c, a beta 2 integrin critically involved in T-cell activation. *J Invest Dermatol* *103*, 775-779.
- Mueller, S.N., and Germain, R.N. (2009). Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature reviews. Immunology* *9*, 618-629.
- Muller, G., Hopken, U.E., and Lipp, M. (2003). The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol Rev* *195*, 117-135.

- Musso, T., Deaglio, S., Franco, L., Calosso, L., Badolato, R., Garbarino, G., Dianzani, U., and Malavasi, F. (2001). CD38 expression and functional activities are up-regulated by IFN-gamma on human monocytes and monocytic cell lines. *J Leukoc Biol* 69, 605-612.
- Nagayama, H., Sato, K., Kawasaki, H., Enomoto, M., Morimoto, C., Tadokoro, K., Juji, T., Asano, S., and Takahashi, T.A. (2000). IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 165, 59-66.
- Nagler-Anderson, C., and Shi, H.N. (2001). Peripheral nonresponsiveness to orally administered soluble protein antigens. *Crit Rev Immunol* 21, 121-131.
- Naik, S.H., Metcalf, D., van Nieuwenhuijze, A., Wicks, I., Wu, L., O'Keeffe, M., and Shortman, K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7, 663-671.
- Naik, S.H., Proietto, A.I., Wilson, N.S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M.H., O'Keeffe, M., Shao, Q.X., Chen, W.F., *et al.* (2005). Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 174, 6592-6597.
- Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., *et al.* (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8, 1217-1226.
- Nakano, H., and Gunn, M.D. (2001). Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the *plt* mutation. *J Immunol* 166, 361-369.
- Narni-Mancinelli, E., Campisi, L., Bassand, D., Cazareth, J., Gounon, P., Glaichenhaus, N., and Lauvau, G. (2007). Memory CD8⁺ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI⁺ phagocytes. *J Exp Med* 204, 2075-2087.
- Nencioni, A., Grunebach, F., Zobywalski, A., Denzlinger, C., Brugger, W., and Brossart, P. (2002). Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 169, 1228-1235.
- Nouri-Shirazi, M., and Guinet, E. (2002). Direct and indirect cross-tolerance of alloreactive T cells by dendritic cells retained in the immature stage. *Transplantation* 74, 1035-1044.
- O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J.L., Anders, E.M., Wu, L., Lahoud, M.H., Henri, S., Scott, B., *et al.* (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function,

- that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* **196**, 1307-1319.
- Ochsenbein, A.F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286**, 2156-2159.
- Ogawa, S., Lozach, J., Benner, C., Pascual, G., Tangirala, R.K., Westin, S., Hoffmann, A., Subramaniam, S., David, M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* **122**, 707-721.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Forster, R. (2004). CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* **21**, 279-288.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* **8**, 1207-1216.
- Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annual review of immunology* **9**, 617-648.
- Ouaaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y., and Beg, A.A. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* **16**, 257-270.
- Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature reviews. Immunology* **3**, 383-391.
- Partida-Sanchez, S., Cockayne, D.A., Monard, S., Jacobson, E.L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., *et al.* (2001). Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med* **7**, 1209-1216.
- Partida-Sanchez, S., Gasser, A., Fliegert, R., Siebrands, C.C., Dammermann, W., Shi, G., Mousseau, B.J., Sumoza-Toledo, A., Bhagat, H., Walseth, T.F., *et al.* (2007a). Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by adp-ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction. *J Immunol* **179**, 7827-7839.
- Partida-Sanchez, S., Goodrich, S., Kusser, K., Oppenheimer, N., Randall, T.D., and Lund, F.E. (2004). Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity* **20**, 279-291.

- Partida-Sanchez, S., Randall, T.D., and Lund, F.E. (2003). Innate immunity is regulated by CD38, an ecto-enzyme with ADP-ribosyl cyclase activity. *Microbes Infect* 5, 49-58.
- Partida-Sanchez, S., Rivero-Nava, L., Shi, G., and Lund, F.E. (2007b). CD38: an ecto-enzyme at the crossroads of innate and adaptive immune responses. *Adv Exp Med Biol* 590, 171-183.
- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-763.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693-704.
- Penna, G., Sozzani, S., and Adorini, L. (2001). Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 167, 1862-1866.
- Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* 13, 3198-3208.
- Perraud, A.L., Schmitz, C., and Scharenberg, A.M. (2003). TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function. *Cell Calcium* 33, 519-531.
- Perrier, P., Martinez, F.O., Locati, M., Bianchi, G., Nebuloni, M., Vago, G., Bazzoni, F., Sozzani, S., Allavena, P., and Mantovani, A. (2004). Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. *J Immunol* 172, 7031-7042.
- Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B.E., Dal Cin, E., Allavena, P., and Di Carlo, V. (2000). Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 164, 4443-4451.
- Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.
- Poulin, L.F., Henri, S., de Bovis, B., Devilard, E., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2007). The dermis contains langerin⁺ dendritic cells that develop and

- function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204, 3119-3131.
- Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-360.
- Proietto, A.I., Lahoud, M.H., and Wu, L. (2008). Distinct functional capacities of mouse thymic and splenic dendritic cell populations. *Immunology and cell biology* 86, 700-708.
- Pulendran, B. (2005). Variegation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol* 174, 2457-2465.
- Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Gottlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P., and Schutz, G. (2001). Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 20, 7168-7173.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.
- Reis e Sousa, C., Hieny, S., Schariton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819-1829.
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277, 18793-18800.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000a). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14, 2819-2830.
- Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 459-481.
- Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., and Mangelsdorf, D.J. (2000b). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289, 1524-1529.
- Riol-Blanco, L., Sanchez-Sanchez, N., Torres, A., Tejedor, A., Narumiya, S., Corbi, A.L., Sanchez-Mateos, P., and Rodriguez-Fernandez, J.L. (2005). The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol* 174, 4070-4080.

-
- Robbiani, D.F., Finch, R.A., Jager, D., Muller, W.A., Sartorelli, A.C., and Randolph, G.J. (2000). The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103, 757-768.
- Robinson-Rechavi, M., and Laudet, V. (2003). Bioinformatics of nuclear receptors. *Methods Enzymol* 364, 95-118.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., and Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20, 1405-1428.
- Rowden, G., Lewis, M.G., and Sullivan, A.K. (1977). Ia antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature* 268, 247-248.
- Sabol, S.L., Brewer, H.B., Jr., and Santamarina-Fojo, S. (2005). The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res* 46, 2151-2167.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 179, 1109-1118.
- Sallusto, F., Nicolo, C., De Maria, R., Corinti, S., and Testi, R. (1996). Ceramide inhibits antigen uptake and presentation by dendritic cells. *J Exp Med* 184, 2411-2416.
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29, 1617-1625.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760-2769.
- Sanchez-Sanchez, N., Riol-Blanco, L., de la Rosa, G., Puig-Kroger, A., Garcia-Bordas, J., Martin, D., Longo, N., Cuadrado, A., Cabanas, C., Corbi, A.L., *et al.* (2004). Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* 104, 619-625.
- Sanchez-Sanchez, N., Riol-Blanco, L., and Rodriguez-Fernandez, J.L. (2006). The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 176, 5153-5159.
- Sato, K., Kawasaki, H., Nagayama, H., Enomoto, M., Morimoto, C., Tadokoro, K., Juji, T., and Takahashi, T.A. (2001). Signaling events following chemokine

- receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages. *Int Immunol* **13**, 167-179.
- Scandella, E., Fink, K., Junt, T., Senn, B.M., Lattmann, E., Forster, R., Hengartner, H., and Ludewig, B. (2007). Dendritic cell-independent B cell activation during acute virus infection: a role for early CCR7-driven B-T helper cell collaboration. *J Immunol* **178**, 1468-1476.
- Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R., and Groettrup, M. (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **100**, 1354-1361.
- Scandella, E., Men, Y., Legler, D.F., Gillessen, S., Prikler, L., Ludewig, B., and Groettrup, M. (2004). CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* **103**, 1595-1601.
- Schaerli, P., and Moser, B. (2005). Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol Res* **31**, 57-74.
- Schluns, K.S., and Lefrancois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* **3**, 269-279.
- Schneider, M.A., Meingassner, J.G., Lipp, M., Moore, H.D., and Rot, A. (2007). CCR7 is required for the in vivo function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* **204**, 735-745.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., *et al.* (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* **14**, 2831-2838.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* **206**, 3101-3114.
- Schuster, G.U., Parini, P., Wang, L., Alberti, S., Steffensen, K.R., Hansson, G.K., Angelin, B., and Gustafsson, J.A. (2002). Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation* **106**, 1147-1153.
- Schwartz, K., Lawn, R.M., and Wade, D.P. (2000). ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 794-802.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* **26**, 421-452.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59-70.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator

- recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**, 927-937.
- Shin, E.H., Lee, H.Y., and Bae, Y.S. (2006). Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 606-611.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 581-592.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* **161**, 1083-1086.
- Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* **159**, 4772-4780.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-296.
- Steinman, R.M., and 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.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K., and Nussenzweig, M. (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences* **987**, 15-25.
- Steinman, R.M., and Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**, 17-58.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M., and Germain, R.N. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296**, 1873-1876.
- Stutte, S., Jux, B., Esser, C., and Forster, I. (2008). CD24a expression levels discriminate Langerhans cells from dermal dendritic cells in murine skin and lymph nodes. *J Invest Dermatol* **128**, 1470-1475.
- Szatmari, I., Gogolak, P., Im, J.S., Dezso, B., Rajnavolgyi, E., and Nagy, L. (2004). Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. *Immunity* **21**, 95-106.
- Szatmari, I., and Nagy, L. (2008). Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *The EMBO journal* **27**, 2353-2362.

- Tangirala, R.K., Bischoff, E.D., Joseph, S.B., Wagner, B.L., Walczak, R., Laffitte, B.A., Daige, C.L., Thomas, D., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., *et al.* (2002). Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11896-11901.
- Terasaka, N., Hiroshima, A., Ariga, A., Honzumi, S., Koieyama, T., Inaba, T., and Fujiwara, T. (2005). Liver X receptor agonists inhibit tissue factor expression in macrophages. *FEBS J* *272*, 1546-1556.
- Thelen, M. (2001). Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* *2*, 129-134.
- Thomas, W.R., Edwards, A.J., Watkins, M.C., and Asherson, G.L. (1980). Distribution of immunogenic cells after painting with the contact sensitizers fluorescein isothiocyanate and oxazolone. Different sensitizers form immunogenic complexes with different cell populations. *Immunology* *39*, 21-27.
- Tomasello, E., Desmoulins, P.O., Chemin, K., Guia, S., Cremer, H., Ortaldo, J., Love, P., Kaiserlian, D., and Vivier, E. (2000). Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. *Immunity* *13*, 355-364.
- Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D.J. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* *17*, 985-993.
- Torchia, J., Glass, C., and Rosenfeld, M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol* *10*, 373-383.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* *387*, 677-684.
- Torocsik, D., Barath, M., Benko, S., Szeles, L., Dezso, B., Poliska, S., Hegyi, Z., Homolya, L., Szatmari, I., Lanyi, A., and Nagy, L (2010). Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *J Immunol* *184*, 5456-5465.
- Trogan, E., Feig, J.E., Dogan, S., Rothblat, G.H., Angeli, V., Tacke, F., Randolph, G.J., and Fisher, E.A. (2006). Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3781-3786.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., and Evans, R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* *65*, 1255-1266.
- Valledor, A.F., Hsu, L.C., Ogawa, S., Sawka-Verhelle, D., Karin, M., and Glass, C.K. (2004). Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 17813-17818.

- van den Berg, T.K., Breve, J.J., Damoiseaux, J.G., Dopp, E.A., Kelm, S., Crocker, P.R., Dijkstra, C.D., and Kraal, G. (1992). Sialoadhesin on macrophages: its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J Exp Med* 176, 647-655.
- van Etten, E., and Mathieu, C. (2005). Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97, 93-101.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.
- Vassileva, G., Soto, H., Zlotnik, A., Nakano, H., Kakiuchi, T., Hedrick, J.A., and Lira, S.A. (1999). The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes. *J Exp Med* 190, 1183-1188.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., and Tontonoz, P. (2000a). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12097-12102.
- Venkateswaran, A., Repa, J.J., Lobaccaro, J.M., Bronson, A., Mangelsdorf, D.J., and Edwards, P.A. (2000b). Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 275, 14700-14707.
- Vermi, W., Riboldi, E., Wittamer, V., Gentili, F., Luini, W., Marrelli, S., Vecchi, A., Franssen, J.D., Communi, D., Massardi, L., *et al.* (2005). Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. *J Exp Med* 201, 509-515.
- Verschuren, L., de Vries-van der Weij, J., Zadelaar, S., Kleemann, R., and Kooistra, T. (2009). LXR agonist suppresses atherosclerotic lesion growth and promotes lesion regression in apoE*3Leiden mice: time course and mechanisms. *J Lipid Res* 50, 301-311.
- Vizzardelli, C., Pavelka, N., Luchini, A., Zanoni, I., Bendickson, L., Pelizzola, M., Beretta, O., Foti, M., Granucci, F., Nilsen-Hamilton, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2006). Effects of dexamethazone on LPS-induced activation and migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis. *Eur J Immunol* 36, 1504-1515.
- Villablanca, E.J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzoni, M., Valentini, B., Bregni, M., *et al.* (2010). Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 16, 98-105.

- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* *164*, 2978-2986.
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., and Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* *176*, 47-58.
- Wagner, B.L., Valledor, A.F., Shao, G., Daige, C.L., Bischoff, E.D., Petrowski, M., Jepsen, K., Baek, S.H., Heyman, R.A., Rosenfeld, M.G., *et al.* (2003). Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol Cell Biol* *23*, 5780-5789.
- Waldo, S.W., Li, Y., Buono, C., Zhao, B., Billings, E.M., Chang, J., and Kruth, H.S. (2008). Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* *172*, 1112-1126.
- Walseth, T.F., and Lee, H.C. (1993). Synthesis and characterization of antagonists of cyclic-ADP-ribose-induced Ca²⁺ release. *Biochim Biophys Acta* *1178*, 235-242.
- Webb, P., Anderson, C.M., Valentine, C., Nguyen, P., Marimuthu, A., West, B.L., Baxter, J.D., and Kushner, P.J. (2000). The nuclear receptor corepressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs). *Mol Endocrinol* *14*, 1976-1985.
- Weninger, W., and von Andrian, U.H. (2003). Chemokine regulation of naive T cell traffic in health and disease. *Semin Immunol* *15*, 257-270.
- Wilson, N.S., El-Sukkari, D., Belz, G.T., Smith, C.M., Steptoe, R.J., Heath, W.R., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* *102*, 2187-2194.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* *9*, 1033-1045.
- Wong, M.M., and Fish, E.N. (2003). Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* *15*, 5-14.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* *203*, 519-527.
- Wright, D.E., Bowman, E.P., Wagers, A.J., Butcher, E.C., and Weissman, I.L. (2002). Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med* *195*, 1145-1154.

- Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., and Weissman, I.L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* *294*, 1933-1936.
- Wu, L., and Shortman, K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* *17*, 304-312.
- Xu, L., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* *9*, 140-147.
- Xu, H., Guan, H., Zu, G., Bullard, D., Hanson, J., Slater, M., and Elmets, C.A. (2001). The role of ICAM-1 molecule in the migration of Langerhans cells in the skin and regional lymph node. *Eur J Immunol* *31*, 3085-3093.
- Yanagawa, Y., and Onoe, K. (2002). CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood* *100*, 1948-1956.
- Yanagawa, Y., and Onoe, K. (2003). CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood* *101*, 4923-4929.
- Yoon, H.G., Chan, D.W., Huang, Z.Q., Li, J., Fondell, J.D., Qin, J., and Wong, J. (2003). Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J* *22*, 1336-1346.
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., and Shultz, L.D. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* *345*, 442-444.
- Zabel, B.A., Silverio, A.M., and Butcher, E.C. (2005). Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. *J Immunol* *174*, 244-251.
- Zammit, D.J., Cauley, L.S., Pham, Q.M., and Lefrancois, L. (2005). Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity* *22*, 561-570.
- Zapata-Gonzalez, F., Rueda, F., Petriz, J., Domingo, P., Villarroya, F., Diaz-Delfin, J., de Madariaga, M.A., and Domingo, J.C. (2008). Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR(gamma):RXR heterodimers: comparison with other polyunsaturated fatty acids. *J Leukoc Biol* *84*, 1172-1182.
- Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E.G., Landreth, G.E., Vinters, H.V., and Tontonoz, P. (2007). Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10601-10606.
- Zelcer, N., and Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* *116*, 607-614.

- Zenke, M., and Hieronymus, T. (2006). Molecular switches and developmental potential of adult stem cells. Ernst Schering Res Found Workshop, 69-79.
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B.T., and Roeder, R.G. (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol Cell* 9, 611-623.

