

UCH - FC
Biotecnología
E77
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE Delta-4 Y Jagged-2 EN LA POLARIZACIÓN DE LA
RESPUESTA INMUNE**

SEMINARIO DE TÍTULO
ENTREGADO A LA UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

POR

PABLO DAVID ESPEJO TRUJILLO



DIRECTORES DE TESIS:

MARIA ROSA BONO

MARIO ROSEMBLATT

Santiago, 2009



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr.

PABLO DAVID ESPEJO TRUJILLO

**“PAPEL DE Delta-4 Y Jagged-2 EN LA POLARIZACIÓN DE
LA RESPUESTA INMUNE”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora Seminario de Título

Mario Rosenblatt

Juan Alberto Fierro

Comisión de Evaluación

Dr. Juan Alberto Fierro Correa

Presidente Comisión

Fierro



Dra. María Inés Becker Contreras
Evaluadora

maría inés becker

Santiago de Chile, 19 Mayo 2009



Sin duda, mi encanto por la biología quedó sellado desde muy pequeño, tempranamente influenciado por mi papa, un biólogo evolutivo sin remedio que me llevaba a la facultad de ciencias desde los 10 años o antes. Ahí, me fascinaba mirando objetos en la lupa u observando cromosomas de *Liolaemus* cuando solo sabía que eran “palitos” cruzados dentro de las células.

Amo salir a terreno y observar todos los animales y plantas que pueda, lo que derivó en querer saber como funcionaba todo lo que veía pero *por dentro*. Fue así como caí sin querer en la biotecnología cuando empezaba el periodo de bachillerato, por suerte en este mismo campus. Durante estos años mi interés biológico ha sido bastante promiscuo ya que he pololeado con estudios de fisiología en lagartos, fisiología vegetal (en mis unidades de investigación), inmunología (seminario de título) y ahora por trabajo, en genómica de plantas. Y no se si lamentable- o afortunadamente, todo me ha gustado. Ahora, mi camino se está yendo hacia las ciencias aplicadas y espero quedarme ahí por un tiempo.



AGRADECIMIENTOS

Uff! son muchas las personas que me acompañaron estos años y que quiero hacer parte de las últimas palabras que redacto de este seminario de título. En primer lugar, agradeceré a quienes tienen influencia directa y aportaron mucho al desarrollo de este trabajo, me refiero a todo el grupo del laboratorio de inmunología, partiendo por los jefes María Rosa y Mario Roseblatt que me recibieron en este laboratorio, guiaron este seminario y me inculcaron la rigurosidad para el trabajo. Daniela y Leo, muchas gracias por tirar buenas vibras en momentos complicados. No se imaginan cuanto aprendí de ustedes. Mis queridos galancetes! Paulita, Jaime y Pablete; espero que alguna vez volvamos a encontrarnos para las conversaciones aquellas. Y todo el inmunogrupo que alegraba los días de trabajo *in da lab*: Vale, Gonzalito (puppy), Fabiola, Ale, Paola, Jenny, Pamela, Evita, Pazita, Carola, Raulete, Felipe. Gracias por la buena onda que me dieron. Tampoco olvidaré de agradecer a Angélica Vega por su paciencia y enseñarme a trabajar en el mesón por primera vez.

Además hay otras personas, que alimentan mi espíritu cada vez que los veo...(*dime con quien andas y te diré quien eres*): Carola, Ferni, Mariela, Tejos, Negro, Felipe, Nacho, Seba, Dunner, Matu-Maca mas todo el CMSD Piantem. Iván, amigo de arriba a abajo y de lo estúpido a lo trascendental, no te fonzees nunca!

Gracias Fer, por arreglártelas para estar ahí siempre, por darme fuerza todo el rato, por darme tanto cariño y hacer que olvide cualquier problema en unos minutos.

Y finalmente gracias a mis padres y familia, grandes responsables de lo que soy ahora, los quiero mucho a todos (aunque no se note...).

ÍNDICE GENERAL



AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La célula dendrítica y polarización de la respuesta inmune	2
1.2 Características generales de la vía de señalización Notch	5
1.3 Notch y el sistema inmune	7
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1 Animales	10
2.2 Anticuerpos	10
2.3 Generación de células dendríticas de médula ósea	10
2.4 Purificación de células dendríticas	11
2.5 Caracterización de células dendríticas	12
2.6 Activación de las células dendríticas	12
2.7 Generación de linfocitos Th1 y Th2	13
2.7 Extracción de RNA total	14

2.8	Síntesis de cDNA	14
2.9	PCR en tiempo real	15
2.10	ELISA	17
3.	RESULTADOS	18
3.1	Caracterización de células dendríticas obtenidas de médula ósea	18
3.2	Cinética de expresión de Delta-4 y Jagged-2 en células dendríticas de ratones C57BL/6	22
3.3	Delta-4 y Jagged-2 se inducen diferencialmente con distintos estímulos en células dendríticas	24
3.4	Efecto de IL-12 en la expresión de Delta-4	27
3.5	Expresión de Delta-4 y Jagged-2 en BMDC de ratones BALB/c	29
3.6	Expresión de Delta-4 en linfocitos T activados y en BMDC activadas vía CD40	32
4.	DISCUSIÓN	34
5.	CONCLUSIONES	38
6.	REFERENCIAS	39





ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	La presencia de IL-4 durante la diferenciación de células dendríticas induce la generación de células con un fenotipo mas maduro.	19
FIGURA 2	IL-4 bloquea la secreción de IL-10 y favorece la secreción de IL-12 por BMDC activadas	21
FIGURA 3	Cinética de expresión de Delta-4 y Jagged-2 en DCs derivadas de ratones C57BL/6	23
FIGURA 4	Expresión diferencial de Delta-4 y Jagged-2 en DCs derivadas de ratones C57BL/6.	26
FIGURA 5	IL-12 actúa en sinergia con CpG en la inducción de Delta-4	28
FIGURA 6	Cinética de expresión de Delta-4 y Jagged-2 en DCs derivadas de ratones BALB/c.	30
FIGURA 7	Expresión diferencial de Delta-4 y Jagged-2 en DCs derivadas de ratones BALB/c.	31
FIGURA 8	Delta-4 se induce en células dendríticas tratadas con anti-CD40.	33
TABLA 1	Descripción de los diferentes estímulos utilizados en BMDC	25

ABREVIATURAS

APC:	célula presentadora de antígeno
Ag:	antígeno
BCR:	receptor de células B
BMDC:	célula dendrítica derivada de médula ósea
CT:	toxina del cólera
CpG:	oligonucleótido CpG
DC(s):	célula(s) dendrítica(s)
DMEM:	medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA:	ácido desoxiribonucleico
DTT:	ditiotreitól
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario
EDTA:	ácido etilen diamino tetra acético
ELISA:	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
FBS:	suero fetal bovino
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF:	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
HRP:	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
ICN:	Dominio intracelular de Notch
IFN- γ :	interferón gamma
IL-4:	interleuquina 4
IL-5:	interleuquina 5
IL-10:	interleuquina 10

IL-12:	interleuquina 12
IL-13:	interleuquina 13
IMDM:	medio Dulbecco modificado por Iscove
kDa:	kiloDaltons
LPS:	lipopolisacárido
LT:	linfocito T
LT CD4+:	linfocito T <i>helper</i>
MACS:	<i>magnetic activated cell sorter</i>
MHC-I:	complejo principal de histocompatibilidad de clase I
MHC-II:	complejo principal de histocompatibilidad de clase II
NK:	células <i>natural killer</i>
dNTP:	deoxi-nucleótido fosfato
PBS:	tampón fosfato salino
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
PE:	ficoeritrina
PGE2:	prostaglandina E2
PRRS:	<i>pattern recognition receptors</i>
RNA:	ácido ribonucleico
mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
rpm:	revoluciones por minuto
RPMI 1640:	medio de cultivo celular
RT-PCR:	reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
TCR:	receptor de linfocitos T
TLR:	<i>Toll-like receptor</i>
Th1:	linfocito T helper 1

Th2: linfocito T helper 2

TMB: tetra-metil-bencidina

RÉSUMEN

Las células dendríticas (DCs) cumplen un papel central en el desarrollo de la respuesta inmune puesto que son capaces de iniciar y dirigir la respuesta adaptativa hacia un tipo de respuesta tipo Th1 o Th2. Esto ocurre durante la estrecha interacción de las DCs y los linfocitos T (LT) en los órganos linfoides secundarios. Una respuesta Th1 se inicia cuando la interacción entre la DC y el LT ocurre en presencia de IL-12, no obstante se ha demostrado diferenciación hacia Th1 independiente de IL-12. Las respuestas Th2 se inician en presencia de IL-4 aunque no hay consenso acerca de cuál es la fuente inicial de esta citoquina.

La vía de señalización Notch participa en eventos de diferenciación celular en una variedad de tejidos y es esencial en la diferenciación de los linfocitos T en el timo. Por otro lado, se ha propuesto que la vía Notch cumple un papel importante en la polarización de la respuesta inmune hacia Th1/Th2, puesto que existe evidencia que las DCs expuestas a estímulos Th1 o Th2, aumentan la expresión de los ligandos de Notch, a saber Delta o Jagged respectivamente.

En este trabajo demostramos que estímulos promotores de respuestas Th1 (LPS y CpG) inducen un aumento de la expresión génica de Delta-4 en DCs de manera independiente de IL-4, en cambio moléculas promotoras de respuestas Th2 (CT y PGE2) inducen la expresión de Jagged-2 en DCs de manera dependiente de IL-4. Esta inducción es máxima entre las primeras 6 a 12 horas luego del encuentro con el antígeno.

Dado que IL-12 es un fuerte mediador de respuestas Th1, se analizó si esta citoquina regula la expresión de Delta-4 en células dendríticas. Encontramos que IL-12 no induce la expresión de este ligando por si sola, sin embargo actúa sinérgicamente

con CpG para aumentar la expresión de Delta-4 en DCs. Por otro lado, observamos que CD40 es un regulador positivo de la expresión de Delta-4 en DCs, hecho no reportado en la literatura hasta el momento. Por último, observamos que si bien los LT CD4⁺ también expresan los ligandos de Notch, el nivel de expresión de Delta-4 y Jagged-2 en Th1 y Th2 fue bajo o similar a DCs no estimuladas.

Finalmente, las evidencias presentadas en esta tesis apoyan la hipótesis de la participación de la vía de señalización Notch como un importante código de comunicación utilizado por la DC para direccionar el curso de la respuesta inmune adaptable.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) play a key role in the course of the immune response since they are capable of initiating and directing adaptive immune responses towards Th1 or Th2 phenotypes. This occurs during the close DC-T cell interaction at the secondary lymphoid organ. Th1 responses are initiated when interaction between DCs and T cells occurs in the presence of IL-12, however there is evidence of the generation of Th1 responses in an IL-12-independent manner. Th2 responses arise in the presence of IL-4, but there is still no agreement about the initial source of this cytokine.

The Notch pathway is involved in cell fate decisions in several tissues and it has an essential role on T cell lineage commitment in the thymus. On the other hand, it has been proposed that Notch pathway plays an important role in the polarization of the immune response since there is evidence supporting the fact that DCs upregulate the Notch ligands, Delta or Jagged after the activation with Th1 or Th2 stimuli respectively.

In this work we show that Th1-promoting stimuli (LPS and CpG) trigger an increase in Delta-4 gene expression on DCs regardless of IL-4, while Th2-promoting molecules (CT and PGE₂) trigger an increase in Jagged-2 gene expression on DCs, but in this case, the effect depends on IL-4. This induction has a peak during the first 6 to 12 hours after antigen recognition.

Since IL-12 is a strong mediator of Th1 responses, we analyzed whether this cytokine regulates Delta-4 gene expression on DCs. We found that although IL-12 cannot induce Delta-4 for itself, it acts in synergy with CpG triggering an increase on Delta-4 expression on DCs. On the other hand, we observed that CD40 is a potent positive regulator of Delta-4 expression on DC, a fact that has not been reported until today. Finally, we demonstrate that although Th1 and Th2 cells express the Notch

ligands, Delta 4 and Jagged 2, their level of expression of is lower or similar to untreated DCs.

In conclusion, the evidence presented here supports the hypothesis that the Notch pathway constitutes an important communication code used by DCs to direct the course of adaptive immune responses.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune posee una gran cantidad de herramientas para detectar, neutralizar y destruir tanto agentes patógenos como células propias en proceso de envejecimiento. Los principales mecanismos de defensa existentes en el sistema inmune se diferencian esencialmente en la especificidad del reconocimiento, la velocidad de respuesta y la capacidad de generar memoria (Abbas, 2005). La primera barrera de defensa contra los patógenos es la **respuesta inmune innata**, en la cual está involucrada la piel, células fagocíticas, células NK y factores solubles como citoquinas y sistema del complemento (Hoffmann y col, 1999). Este tipo de respuesta se caracteriza por ocurrir rápidamente debido al reconocimiento de patrones moleculares comunes presentes en una gran cantidad de patógenos y por carecer de memoria, lo que significa que la respuesta inmune innata ocurre de manera muy similar frente a repetidos encuentros con el mismo microbio. El segundo mecanismo de defensa, la **respuesta inmune adaptable**, requiere de una célula presentadora de antígenos (APC, por *antigen presenting cell*) que reconozca al microbio en el lugar de entrada, que lo fagocite y lo procese para luego presentar péptidos provenientes del patógeno en moléculas presentadoras denominadas **moléculas de histocompatibilidad** (MHC). Este último proceso, denominado *presentación antigénica*, ocurre en el órgano linfoide más cercano al lugar donde la célula dendrítica reconoció al patógeno y permite que el linfocito o célula efectora pueda reconocer al antígeno (Ag) y ser activado. Este reconocimiento gatilla una cascada de señalización interna en el linfocito, que induce su proliferación y diferenciación. Dependiendo de la naturaleza del patógeno y de la vía de ingreso al tejido, se activarán linfocitos T CD4+ los cuales producirán citoquinas que activarán células efectoras capaces de eliminar al

patógeno o bien adquirirán la capacidad de eliminar al patógeno directamente como es el caso de los linfocitos T CD8+. En ambos casos se generarán linfocitos T de memoria, capaces de producir una respuesta efectora mucho más eficiente frente a encuentros sucesivos con el mismo microbio.

Cada linfocito T (LT) o B (LB) presenta en su superficie un receptor para el antígeno capaz de reconocer de manera muy específica a un *probable antígeno*. El receptor del linfocito B o T (BCR o TCR, respectivamente) se produce por recombinación y reordenamiento somático previo al reconocimiento del antígeno. De esta forma, el sistema inmune ha evolucionado para reconocer prácticamente cualquier molécula presente en organismos patógenos.

1.1 La célula dendrítica y polarización de la respuesta inmune

El sistema inmune adaptable cuenta con dos mecanismos efectores principales. El primero de ellos corresponde a la *respuesta humoral*, mediada por anticuerpos producidos por los LB activados, los que opsonizan al microorganismo blanco atrayendo a macrófagos o activando al sistema del complemento para la eliminación definitiva del microbio. En el segundo mecanismo la respuesta inmune es efectuada directamente por los LT y se denomina *respuesta celular*. El direccionamiento hacia un tipo de respuesta celular o humoral es lo que se denomina *polarización de la respuesta inmune* y es mediada por linfocitos Th1 y Th2 respectivamente.

Si bien no se han identificado proteínas de superficie que permitan identificar inequívocamente linfocitos Th1 o Th2, se conocen claramente algunos factores de transcripción específicos de cada fenotipo y el patrón de citoquinas que éstos producen después de ser activados. Así, se ha demostrado que los linfocitos Th1 expresan el

factor de transcripción T-bet y secretan preferencialmente interferón gama (IFN- γ) (Murphy y Reiner, 2002). Estos linfocitos se caracterizado por desencadenar inmunidad celular en respuesta a patógenos intracelulares (Trinchieri, 2003). Los linfocitos Th2 expresan el factor de transcripción GATA-3 y secretan IL-4, IL-5 e IL-13 (Mowen y col, 2004). Este fenotipo favorece el desarrollo de inmunidad humoral que es la forma más idónea para neutralizar parásitos extracelulares (Murphy y Reiner, 2002). Se ha demostrado además que las citoquinas que producen los LT, una vez activado su programa de diferenciación, funcionan como factores de crecimiento autocrino y a la vez inhibitorios de la diferenciación hacia el fenotipo opuesto.

Hoy en día existen varias hipótesis respecto del evento iniciador de la polarización de la respuesta inmune, pero existe consenso respecto del papel esencial de las DCs en llevar a cabo el programa de diferenciación de los LT CD4⁺. Las DCs juegan un rol preponderante como procesadoras y presentadoras de antígenos pero además son las únicas células capaces de activar LT vírgenes por lo que se les denomina *APC profesionales* (Banchereau y Steinman, 1998). Las DCs reconocen patógenos o entidades extrañas a través de receptores para motivos moleculares (PRRs) expresados principalmente por microorganismos. Una vez realizado este reconocimiento, las DCs fagocitan y procesan al microbio en compartimentos endosomales para luego presentar pequeños fragmentos de proteínas provenientes del microbio en moléculas del tipo MHC-II. Durante este proceso, la DC sufre fuertes cambios fenotípicos y morfológicos acompañado de cambios en la expresión génica, los cuales permiten su movilización y en conjunto determinan una disminución de la capacidad fagocítica y un aumento en la capacidad de presentar antígenos, activar LT CD4⁺ e inducir su diferenciación (Kapsenberg, 2003).

Algunos de los cambios funcionales que ocurren en las DCs son el aumento de expresión de moléculas MHC, moléculas coestimuladoras como CD80 o CD86 (Kapsenberg, 2003), cambios en la expresión de receptores de quimioquinas que facultan a las DCs para migrar al órgano linfoide más apropiado y permanecer en sitios donde se localizan los LT (Sallusto y col, 1998). La estrecha interacción que ocurre entre el LT y la DC se denomina *sinápsis inmunológica*. Durante dicha sinápsis ocurren eventos que gatillan el inicio, potenciación y polarización de una respuesta inmune adaptable. Para el **inicio** de la respuesta inmune adaptable es necesaria la unión entre el TCR del LT CD4⁺ y un péptido particular presentado en una molécula MHC-II por la DC. Además se requiere de la interacción entre moléculas coestimuladoras (CD80 y/o CD86) expresadas en la membrana de la DC, con su receptor CD28 presente en el LT CD4⁺ (Banchereau, 2000). Durante esta interacción el LT expresa CD40L, que interactúa con CD40 en la DC, lo que lleva a una **potenciación** de la respuesta inmune adaptable (Sousa y col, 1997). Por último, la **polarización** de la respuesta inmune ocurre por efecto de factores solubles presentes en el microambiente linfoide durante el contacto entre el LT y las DCs (Iwazaki y col, 2004; Trinchieri, 2003). Existe evidencia creciente que además de los factores solubles, la interacción entre receptores Notch presentes en los LT CD4⁺ y sus ligandos Delta y Jagged presentes en las DCs, determinarían la subsecuente polarización de los LT efectores (Amsen y col, 2004).

Las citoquinas son factores solubles determinantes en la polarización de la respuesta inmune. De esta forma, si la IL-12 está presente durante la activación de los LT CD4⁺, éstos se diferenciarán hacia un fenotipo Th1, mientras que el fenotipo Th2 se produce principalmente en presencia de IL-4.

La IL-12 es producida por macrófagos y DCs activadas por estímulos captados por receptores de tipo Toll (TLR) (Reis y col, 1997; Boonstra y col, 2003) y a pesar de

ser un importante inductor de la polarización de los LT CD4⁺ hacia un fenotipo Th1, existen evidencias de la generación de respuestas de tipo Th1 en ausencia de IL-12 (Jankovic, 2002; Schijns, 1998). Por otra parte, se ha descrito que las DCs no producen IL-4, hecho que ha llevado a plantear que el direccionamiento de la respuesta inmune hacia un fenotipo Th2 ocurre más bien por defecto, es decir en ausencia de IL-12 (Moser y Murphy, 2000).

Estudios recientes corroborados por nuestro laboratorio, demostraron que IL-4 además ser indispensable para que se lleven a cabo respuestas Th2, es capaz de aumentar la secreción de IL-12 por DCs derivadas de médula ósea (Yao y col, 2005; Sauma y col, 2004), de manera que el papel de IL-4 en polarización de los LT parece controversial, por lo menos hasta que se identifique la población celular que produce IL-4 de forma temprana. Por otro lado, se ha reportado la generación de respuestas Th2 en ratones que no pueden detectar la IL-4 (Noben-Trauth, 1997) o por activación de DCs con toxina del cólera (CT) o prostaglandina E2 (PGE2) (Jankovic, 2000; Kapsenberg, 2003), con lo que no se descarta que exista una señal en la DC que induzca este tipo de respuesta. Por otra parte, se ha descrito que la vía de señalización Notch podría actuar como señal inductora de diferenciación Th1/Th2. Tanto Notch como sus ligandos se expresan en LT CD4⁺ y DCs respectivamente (Adler y col, 2003; Yamaguchi y col, 2002) y podrían ser parte de aquellos eventos desconocidos que podrían estar influyendo en la polarización de la respuesta inmune

1.2 Características generales de la vía de señalización Notch.

Notch es una familia de receptores de membrana capaces de transducir señales de regulación transcripcional al interior de la célula. Su función principal radica

en regular procesos de diferenciación durante la ontogenia de diversos linajes celulares, por ende está relacionado con morfogénesis, muerte celular programada y proliferación celular. Estos receptores son altamente conservados y se expresan tanto en invertebrados como vertebrados (Artavanis-Tsakonas y col, 1999). De hecho Notch, fue descrito inicialmente en *Drosophila melanogaster* donde experimentos de pérdida de función por mutación inducían una alteración en el fenotipo de las alas, que se expresaba como una muesca en la punta de éstas (de ahí el nombre "Notch" cuya traducción literal al español es "muesca") (Morgan, 1917). En mamíferos se han descrito 4 receptores Notch (Notch1-4). De éstos, sólo Notch1 y Notch2 son imprescindibles para la viabilidad embrional en ratones, deduciéndose que los distintos receptores no cumplen funciones redundantes al menos durante la embriogénesis (Huppert, 2000; Hamada, 1999). En mamíferos existen dos ligandos de tipo Serrate llamados Jagged (Jagged 1 y 2) y tres ligandos de tipo Delta de nominados Delta-1, 3 y 4 (Maillard, 2005).

Notch es sintetizado en el retículo endoplásmico como un polipéptido de aproximadamente 300 kDa, donde es fucosilado por fucosil-transferasas para su direccionamiento al trans Golgi. En este sitio es cortado por proteasas del tipo furina para formar un heterodímero unido no covalentemente que comprende un dominio extracelular y un dominio transmembrana que expone una porción intracelular. Antes de ser direccionado a la membrana plasmática, el heterodímero es glicosilado por glicosil-transferasas de la familia Fringe. Esta etapa de glicosilación favorece la especificidad de unión entre Notch y los ligandos de tipo Delta. Por el contrario determinados niveles de glicosilación efectuada por Fringe inhiben la señalización de Notch mediada por ligandos tipo Jagged aunque sin afectar necesariamente la afinidad entre este ligando y el receptor (Osborne y Minter, 2007). Una vez que ocurre la

interacción Notch-ligando, la porción extracelular de Notch es cortada por la metaloproteasa ADAM lo que favorece la monoubiquitinación del dominio intracelular permitiendo la endocitosis y el posterior corte de éste por γ -secretasas en un endosoma temprano. El dominio intracelular de Notch (ICN) ya liberado, es dirigido hasta el núcleo donde se asocia con RBP-J, un mediador común a todos los receptores Notch (Kato y col, 1997). En ausencia de ICN, RBP-J es un represor transcripcional ya que se encuentra unido a moléculas co-represoras. La unión de ICN a RBP-J desplaza al co-represor favoreciendo el reclutamiento de co-activadores como MAML, p300 y otros para formar un complejo multiproteico que activa la transcripción de los genes blanco (Osborne y Minter, 2007).

1.3 Notch y el sistema inmune

Una de las funciones mejor documentadas de Notch durante el desarrollo de células linfoides, es su rol crítico en la diferenciación de los linfocitos T. Por ejemplo, está descrito que en ausencia de señalización mediada por Notch 1 y 3 en el timo, los progenitores linfoides no se diferencian a linfocitos T sino a linfocitos B (Radtke y col, 1999; Wilson y col, 2001). Asimismo, la expresión forzada de Notch 1 en médula ósea induce la diferenciación de progenitores linfoides hacia linfocitos T en desmedro de la generación de linfocitos B (Pui y col, 1999).

Consecuentemente con el rol de Notch como regulador de la diferenciación celular, se ha descrito que esta vía de señalización también está implicada en polarización de la respuesta inmune (Maillard, 2003). La señalización mediada por Notch requiere obligadamente de la unión del receptor con sus ligandos. Los ligandos de Notch son proteínas de membrana expresadas en células presentadoras de

antígenos, especialmente en DCs, a excepción de Delta-3 (Yamaguchi y col, 2002). Se ha demostrado que la expresión de los ligandos de Notch en DCs depende del estímulo al cual han sido expuestas. Es así como DCs activadas con estímulos Th1 como LPS presentan una mayor expresión de Delta-4, mientras que DCs activadas con estímulos Th2 como toxina del cólera presentan una mayor expresión de Jagged 1 y 2 (Amsen y col, 2004).

El papel de la vía Notch en la polarización de la respuesta inmune es controversial. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que al fijar distintos ligandos de Notch en placas de cultivo o induciendo la expresión diferencial de éstos en APCs, se generan diferentes perfiles de secreción de citoquinas en LT CD4⁺. De esta forma, se ha asociado la señalización de Notch mediada por Delta-1 y Delta-4 a respuestas de tipo Th1 y al aumento directo de la producción de IFN- γ (Amsen y col, 2004) aunque en una publicación reciente se demuestra que células dendríticas provenientes de médula ósea que expresan Delta-1 o Delta-4 inducen respuestas Th1 debido a que impiden que los LT CD4⁺ respondan a IL-4 suprimiendo así respuestas de tipo Th2 (Sun y col, 2008).

Por otro lado, se ha publicado que la señalización mediada por Jagged-1 y Jagged-2 determina la producción directa de IL-4 por LT CD4⁺ además de la inducción de la expresión del transactivador de IL-4, CNS-2 (Tanaka y col, 2006). Además existen reportes que demuestran que ratones incapaces de expresar MAML, proteína esencial en la señalización mediada por los cuatro receptores Notch, son incapaces de llevar a cabo respuestas Th2 (Tu y col, 2005) sugiriendo que la vía Notch sería determinante en la generación de respuestas Th2.

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes planteados en este trabajo postulamos que las células dendríticas expresan en forma diferencial los ligandos de Notch (Delta-4 y Jagged-2), frente a estímulos que producen respuestas Th1 o Th2, respectivamente.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la expresión diferencial de los ligandos de Notch en células dendríticas y su relación con la polarización de la respuesta inmune.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el estado de maduración y el patrón de citoquinas secretadas en células dendríticas tratadas con estímulos Th1 (LPS, CpG) y estímulos Th2 (CT y PGE2)
- Evaluar la cinética de inducción génica mediante PCR en tiempo real para Delta-4 y Jagged-2 en células dendríticas tratadas con LPS o CT en ratones C57BL/6.
- Comparar la expresión de Delta-4 y Jagged-2 en BMDC de ratones C57BL/6 tratadas con LPS, CpG, CT, PGE2 o con un anticuerpo anti-CD40.

- Evaluar el efecto de IL-12 sobre la expresión de Delta-4 y Jagged-2 en células dendríticas.
- Comparar la expresión de Delta-4 entre células dendríticas y LT CD4+ activados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Para todos los experimentos se utilizaron ratones C57BL/6, OT-II y BALB/C de 2 a 4 meses de edad. De éstos los dos primeros presentan un fondo genético H2^b y el último, H2^d. Ambas cepas fueron adquiridas en Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.) y posteriormente se mantuvieron en el vivero de la Fundación Ciencia para la Vida. La manipulación de los animales se hizo según las reglas del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

2.2 Anticuerpos

En el presente seminario de título se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

Conjugados a FITC: anti-CD86 (clon GL1), anti-IA^d (clon AMS-32.1), anti-IA^b (clon 25-9-17). Conjugado a PE: anti-CD11c (clon HL3). No conjugados: anti-CD40, clon 3/23. Todos los anticuerpos fueron adquiridos en BD Biosciences (EE.UU.). Anticuerpos

acoplados a microperlas magnéticas (MACS): anti-CD11c, clon N418; adquirido de Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania.

2.3 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea

Las células dendríticas de médula ósea (BMDC) se generaron a partir de células precursoras hematopoyéticas extraídas de fémur y tibia de ratones C57BL/6 y BALB/C. Para tal efecto, los huesos se esterilizaron en etanol 75% por un minuto, luego de lo cual fueron perfundidos con medio RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. El tejido perfundido se agitó fuertemente hasta una obtener solución homogénea. Para lisar los glóbulos rojos de la suspensión, las células se centrifugaron a 400 x g y el pellet se incubó en una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 10 mM y Na₂EDTA 0.1 mM, pH 7.2-7.4) por 5 minutos a temperatura ambiente. Para lavar las células, se agregó 20 ml de RPMI + 10% FBS y se centrifugó a 400 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido se resuspendió a una concentración de 1x10⁶ células/ml en medio de diferenciación, el que consiste en RPMI + 10% FBS (GIBCO BRL, Life Technologies, Bethesda, MD, EE.UU) suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml y la citoquina recombinante GM-CSF 10 ng/ml (BD Biosciences, San Diego, CA, EE.UU.). En algunos casos se agregó 1 ng/ml de IL-4 (BD Biosciences, EE.UU.). La suspensión celular se distribuyó en placas de 24 pozos (1 ml/pozo) y se cultivó por 6 días a 37°C y 5% de CO₂. Al segundo y cuarto día de cultivo, se extrajo el 75% del volumen de cada pozo y se reemplazó con 1 ml de medio fresco de diferenciación.

2.4 Purificación de células dendríticas

Al sexto día de cultivo, se extrajeron las células de cada placa por pipeteo y se centrifugaron a 400 x g por 5 minutos. El pellet se resuspendió en 30 µl del anticuerpo monoclonal anti-CD11c acoplado a microperlas magnéticas (clon N418, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) diluido en 300 µl de tampón MACS (PBS + 2 mM EDTA + 5% FBS), y se incubó por 20 minutos a 4°C en agitación rotatoria. Luego se lavaron las células con 1 ml de tampón MACS y se resuspendieron en 500 µl del mismo buffer. La selección positiva de las células marcadas se realizó pasándolas a través de columnas MACS (Columnas LS; Miltenyi Biotec, Alemania) que poseen una matriz que permite obtener un fuerte campo magnético al ser acopladas a un imán (Vario MACS). La selección se realizó según las instrucciones del fabricante.

2.5 Caracterización de células dendríticas

La pureza y el estado de maduración de las células dendríticas se determinó por citometría de flujo. Para esto 5×10^5 células se incubaron por 20 minutos a 4°C y en oscuridad en 100 µl de la mezcla de anticuerpos respectivos diluidos en medio DMEM + 2%FBS. Finalmente las células se lavaron en DMEM + 2%FBS y se resuspenden en 300 µl de PBS + 2% FBS. Para adquirir los datos utilizamos un citómetro FACScan (BD Biosciences, Mountain View, CA). Los datos se analizaron con el programa WinMDI 2.9.

2.6 Activación de las células dendríticas

Las células dendríticas obtenidas se resuspendieron a $2-3 \times 10^6$ /ml en medio de diferenciación (mencionado más arriba), en algunos casos en presencia de IL-4 (1ng/ml). Se adicionaron los siguientes estímulos: LPS 100 ng/ml, oligonucleótido CpG 10 µg/ml, CT 1µg/ml, PGE2 1µM, IL-12p70 10 ng/ml (BD Biosciences, EE.UU.) o un anticuerpo anti-CD40 10µg/ml (BD Biosciences, EE.UU.). La activación se realizó a 37°C y 5%CO₂ durante 0, 4, 6, 12 o 24 hrs, según el experimento. Los sobrenadantes fueron conservados a -80°C para posterior análisis de citoquinas por ELISA de captura y las células dendríticas se lavaron 3 veces en PBS antes de extraer RNA.

2.7 Generación de linfocitos Th1 y Th2

Para la generación de los linfocitos Th1 y Th2, se utilizó un protocolo previamente descrito con algunas modificaciones (Grogan et al. 2001; Minter et al. 2005). Linfocitos T CD4⁺ de ratones OT-II se purificaron a partir del bazo por selección inmunomagnética, se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en medio de co-cultivo (IMDM+10%FBS+ 50 µM 2ME) y se incubaron con 1 µg/ml de un anticuerpo anti-CD28 (BD Biosciences) en placas de 24 pozos (Corning Incorporated) previamente recubiertas con 1 µg/ml de un anticuerpo anti-CD3 (BD Biosciences), estos linfocitos corresponden los descritos como LT en figura 8. En la generación de linfocitos Th1, se agregaron 10 ng/ml de IL-12 (R&D Systems) y 10 µg/ml de un anticuerpo anti-IL-4 (BD Biosciences). Para la diferenciación de linfocitos Th2, las células se incubaron con 20 ng/ml de IL-4 (BD Biosciences) y con 10 µg/ml de un anticuerpo anti- IFN-γ (BD

Biosciences). Al tercer día de incubación, y con el fin de detener la activación policlonal, los linfocitos se traspararon a pozos nuevos que no estaban recubiertos con anti-CD3 y se les agregó 1 ml de medio fresco sin citoquinas ni anticuerpos. El fenotipo resultante de los linfocitos se verificó por citometría de flujo al día 5 en base a la producción de IFN- γ e IL-4.

2.8 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó a partir de $2-3 \times 10^6$ células utilizando el kit RNeasy (QIAGEN, EE.UU.) según el protocolo sugerido por el fabricante. El RNA se cuantificó determinando la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway Limited, Dunow, Inglaterra). El grado de impurezas peptídicas se determinó calculando el coeficiente entre la densidad óptica a 260 nm y 280 nm.

2.9 Síntesis de cDNA

La síntesis del cDNA se realizó a partir de 1 μ g de RNA total, incubando previamente con oligo-dT (Invitrogen, CA, EE.UU) a 70°C por 10 minutos en un volumen de 12 μ l. Luego se agregaron 8 μ l del mix de componentes para la síntesis de cDNA que contenía 5 μ l de buffer de reacción 5x (Tris-HCl 50mM pH 8,3, 375 mM KCl, MgCl₂ 3 mM y 10 mM de dTT) (Promega, EE.UU.), 1,25 μ l de dNTP (10 mM) (Invitrogen), 0,6 μ l de inhibidor de RNasa 40 U (RNasin®, Promega Madison, WI, EE.UU) y 1 μ l de transcriptasa reversa 200 U/ml (MMLV-RT, Promega, Madison, WI, EE.UU.) El volumen final de la mezcla de reacción fue de 20 μ l y el programa utilizado fue 1 hr a 42°C para la acción de la enzima y finalmente 70°C por 15 minutos para la inactivación de ésta. Las reacciones de síntesis de cDNA fueron llevadas a

cabo en un termociclador PTC-150 MiniCycler (MJ Research INC, Watertown, MA, EE.UU.). Para corroborar la calidad del cDNA (e indirectamente de la cuantificación de RNA), se amplificó por PCR (en todas las muestras) un fragmento de 719 pb del gen de β -actina. Los partidores utilizados fueron adquiridos en Bios-Chile (BiosChile, Ingeniería Genética S.A., Santiago, Chile) y tienen la siguiente secuencia:

β -actina *sentido* : 5' GTG ATG ATG CCC AGA AAG ACC 3'

β -actina *anti-sentido* : 5' CTA TTG GCT ATT GAT TGA TTG CTG A 3'

2.10 PCR en tiempo real

A partir de los cDNA obtenidos se amplificó un segmento génico de Delta-4 y Jagged-2 utilizando Master Mix SYBR Green/ROX para PCR en tiempo real (SuperArray Bioscience Corp, EE.UU.). La mezcla de reacción consiste en 12,5 μ l de Master Mix, 1 μ l de la mezcla de partidores S y AS (50 mM) del gen respectivo (Delta-4 o Jagged-2), 10,5 μ l de agua libre de nucleasas y 1 μ l de cDNA como templado. Los partidores para Delta-4 se adquirieron en BiosChile (BiosChile, Ingeniería Genética S.A., Santiago, Chile) y tienen la siguiente secuencia:

Delta-4 *sentido* : 5' GCA CCA ACT CCT TCG TCG TC 3'

Delta-4 *antisentido* : 5' GTT TCC TGG CGA AGT CTC TG 3'

El programa de amplificación para Delta-4 corresponde a un ciclo de 95°C por 10 min; 45 ciclos de 95°C por 30 seg, 58°C por 20 seg, 72°C por 30 seg y un ciclo final de 95°C por 1 min, 58°C por 30 seg, 95°C por 30 seg. En el caso de los partidores para Jagged-2, se adquirieron directamente a SuperArray (SuperArray Bioscience Corp, EE.UU.) y su secuencia no es revelada por la empresa. El programa de amplificación para Jagged-2 corresponde a un ciclo de 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 30 seg y un ciclo final de 95°C por 1 min, 55°C por 30 seg y 95°C por 30 seg. Como control de expresión constitutiva se utilizó el gen HPRT cuyos partidores se adquirieron en BiosChile y tienen la siguiente secuencia:

HPRT *sentido* : 5' CTC CTC AGA CCG CTT TTT GC 3'

HPRT *antisentido* : 5' TAA CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC 3'

Todas las reacciones de amplificación y registro de fluorescencia se realizaron en un termociclador Stratagene MX3000P (Stratagene, CA, EE.UU.). Para determinar la expresión relativa (E.R.) se utilizó el método recomendado por el fabricante del Master mix (SuperArray Bioscience Corp, EE.UU.). Básicamente, se calculó en base al Ct o número de ciclos que le tomó a cada muestra sobrepasar el umbral mínimo de fluorescencia (fijado en la mitad de la curva de amplificación para todos los experimentos) corregido al gen control (HPRT). La fórmula utilizada es la siguiente:

$$E.R. = 2e^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{HPRT}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{(muestra control)}}$$

En todos los experimentos la muestra control fueron BMDC no tratadas y diferenciadas en ausencia de IL-4. Para normalizar las diferencias inherentes entre los ratones, en todos los gráficos se muestra la expresión relativa estandarizada en escala de 1 a 100 donde el valor "100" corresponde a la muestra con mayor E.R.

2.11 ELISA

La secreción de IL-10 e IL-12p70 por las BMDCs expuestas a los diferentes estímulos se ensayó mediante ELISA de captura (OptEIA mouse ELISA set, BD Biosciences). El experimento se realizó en placas de 96 pozos Immuno-plate Maxisorp (Nunc, EE.UU.) a las cuales se agregó 100 μ l por pozo del anticuerpo de captura respectivo diluido 1:125 en "coating buffer" (NaHCO_3 0.33 M, Na_2CO_3 0.66 M, pH 9.5) incubándose a 4°C por toda la noche. Luego la placa se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS + 0.1% Tween 20). Para bloquear se agregó 420 μ l por pozo de solución de bloqueo (PBS + 10% FBS) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con solución de lavado y se agregó 100 μ l por pozo de los sobrenadantes de las BMDC tratadas con diferentes estímulos además de la diluciones de la citoquina recombinante utilizada para la cuantificación. La placa se incubó por 2 horas a temperatura ambiente luego de lo cual se lavó 5 veces con solución de lavado. Posteriormente, se incubó por 1 hora con 100 μ l por pozo del anticuerpo de detección

(biotinilado) diluido 1:250 (ambas citoquinas: IL-12p70 e IL-10) más avidina peroxidasa a la misma dilución. La placa correspondiente se lavó 7 veces antes de agregar la solución de revelado TMB Substrate reagent Set (BD Pharmingen, EE.UU.). Al cabo de unos minutos se agregó 50 μ l por pozo de H_3PO_4 1M para detener la reacción. Finalmente se leyó la densidad óptica de cada pozo a 450 nm en un espectrofotómetro Emax Precision Microplate Reader (Molecular Devices, EE.UU.). Los límites de detección para IL-10 e IL-12p70 fueron de 31,3 pg/ml y 62,5 pg/ml, respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización de células dendríticas obtenidas de médula ósea.

Las DCs fueron producidas desde precursores presentes en la médula ósea de ratones C57BL/6 y diferenciadas con GM-CSF, en presencia o ausencia de IL-4. Al cabo de 6 días de cultivo las DCs fueron seleccionadas con perlas magnéticas conjugadas con un anticuerpo anti-CD11c lo que permite obtener preparaciones de DCs con alrededor de un 85% de pureza.

Las DCs fueron caracterizadas por su estado de maduración y por el patrón de secreción de citoquinas frente a determinados estímulos. En primer lugar evaluamos el estado de maduración de las DCs en base a la expresión de moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y la molécula coestimuladora CD86.

En la Fig. 1 observamos que las DCs producidas en presencia de IL-4 muestran un porcentaje mayor de células MHC-II+ y CD86+ comparadas a las DCs generadas en ausencia de IL-4. Esto concuerda con resultados previos de nuestro laboratorio donde se demostró que IL-4 generaba DCs en un mayor estado de maduración (Sauma y col, 2004).

Enseguida evaluamos la secreción de IL-10 e IL-12 en las DCs activadas con diversos estímulos. Para esto las DCs de ratones C57BL/6 fueron tratadas con LPS (100 ng/ml), CpG (10 µg/ml), CT (1 µg/ml) o PGE2 (1 µM) por 12 horas en presencia o ausencia de IL-4. Los sobrenadantes de las DCs estimuladas fueron ensayados por ELISA de captura para determinar la concentración de IL-10 e IL-12p70. Como control de estos experimentos las DCs se mantuvieron en cultivo por la duración del ensayo y se les denomina No Tratadas (NT).

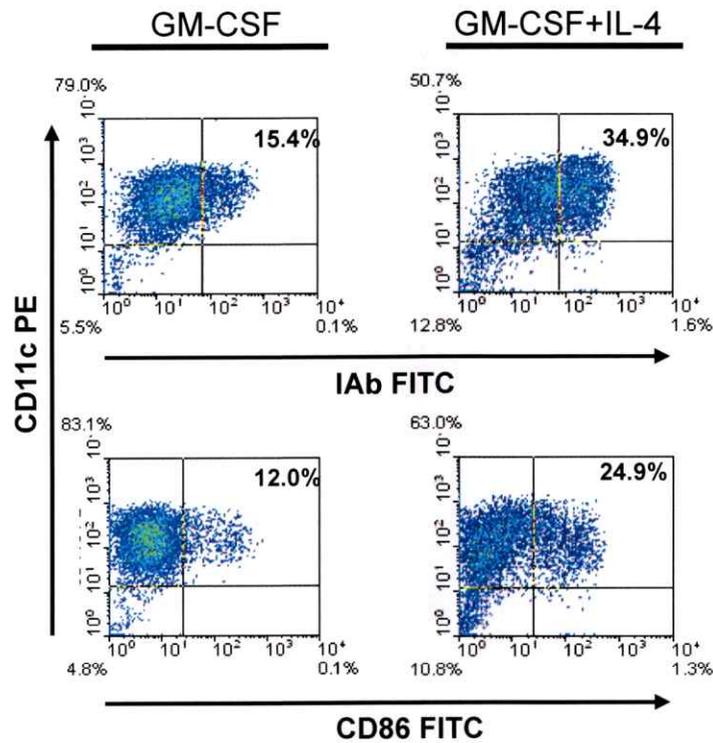
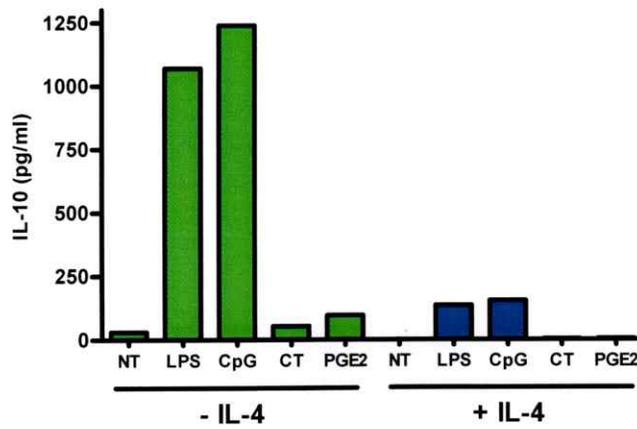


Figura 1. La presencia de IL-4 durante la diferenciación de células dendríticas induce la generación de células con un fenotipo más maduro. Células dendríticas derivadas de ratones C57BL/6 diferenciadas en presencia o ausencia de IL-4 (1 ng/ml) se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de I-A^b y CD86. En los gráficos se muestran los porcentajes de células presentes en cada cuadrante. Resultado representativo de 10 experimentos independientes

Como se observa en la figura 2A y B, las DCs no tratadas no producen cantidades detectables de las citoquinas ensayadas. Las DCs producidas en ausencia de IL-4 producen sobre los 1000 pg/ml de IL-10 frente a LPS y CpG mientras que las DCs producidas en presencia de IL-4 secretan niveles apenas detectables de esta citoquina frente a estos estímulos. Cabe destacar que los estímulos CT y PGE2 no inducen la secreción de IL-10 en las DCs sean éstas diferenciadas en presencia o ausencia de IL-4. En cuanto a la producción de IL-12, podemos observar que principalmente las DCs generadas en presencia de IL-4 producen 3500 pg/ml y 7500 pg/ml en respuesta a LPS y CpG respectivamente aunque CpG parece ser un estímulo que induce esta citoquina sin importar el origen de la DC. Finalmente, las DCs tratadas con CT y PGE2 apenas secretan niveles detectables de IL-10 y nada de IL-12 concordando con trabajos de la literatura que muestran que tales estímulos condicionan a la DC para inducir respuestas Th2 (Kapsenberg, 2003).

A)



B)

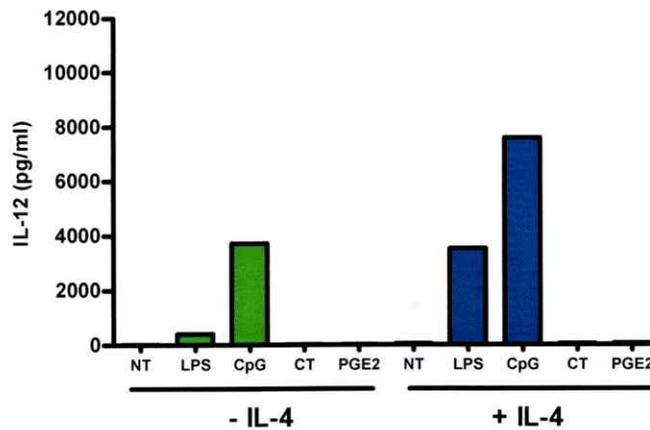


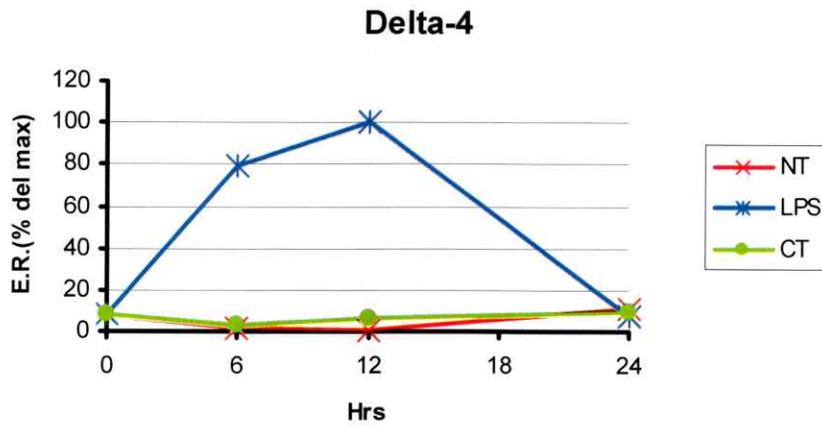
Figura 2. IL-4 bloquea la secreción de IL-10 y favorece la secreción de IL-12 por BMDC activadas. Células dendríticas diferenciadas en ausencia (barras verdes) o presencia de IL-4 (barras azules) se activaron por 12 horas con LPS (100 ng/ml), CpG (1 µg/ml), CT (1 µg/ml) o PGE2 (1 µM). La secreción de IL-10 (A) e IL-12 (B) por estas células se evaluó mediante ELISA de captura. El control no tratado (NT) se dejó 12 horas en medio de diferenciación, (n=1).

3.2 Cinética de expresión de Delta-4 y Jagged-2 en células dendríticas de ratones C57BL/6

Delta-4 y Jagged-2 son ligandos de Notch cuyos RNA mensajeros se expresan en células presentadoras de antígenos como LB, macrófagos y DCs (Yamaguchi E., 2002), sin embargo la presencia de estos ligandos en estas células no ha sido bien estudiada.

La cinética de expresión de Delta-4 y Jagged-2 en DCs estimuladas, se analizó por PCR en tiempo real. Elegimos realizar estos experimentos con DCs activadas en presencia de IL-4 las cuales fueron tratadas con LPS (100 ng/ml) o CT (1 µg/ml) por 6, 12 y 24 hrs. La expresión de Delta-4 y Jagged-2 en DCs recién purificadas fue definida como la expresión relativa a tiempo 0. Como control las DCs se mantuvieron sin tratar en medio de diferenciación durante los mismos tiempos de activación. En la figura 3A observamos que el mRNA para Delta-4 se induce en DCs tratadas con LPS con un máximo de expresión relativa a las 12 horas de activación mientras que el tratamiento con CT no induce Delta-4. Por otro lado, DCs tratadas con CT producen un máximo de expresión del mRNA de Jagged-2 a las 12 horas de activación (Fig. 3B), mientras que LPS no induce significativamente este mRNA. Estos resultados concuerdan con datos de la literatura que muestran que LPS y CT inducen en DCs la expresión de los mRNA de Delta-4 y Jagged-2 respectivamente. (Amsen D., 2004).

A)



B)

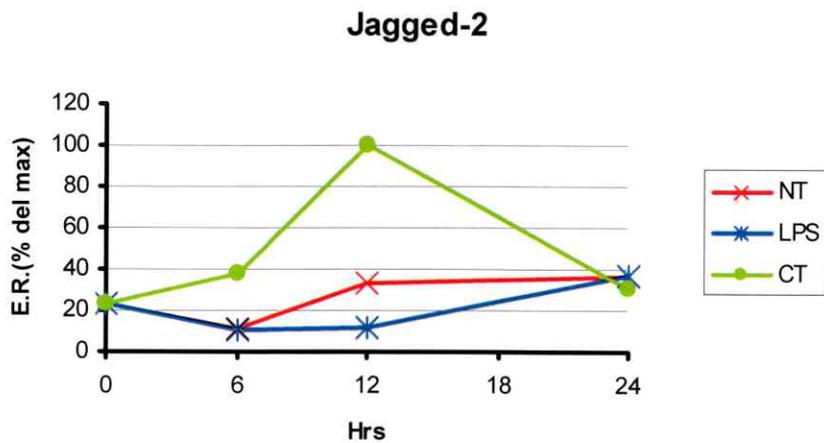


Figura 3. Cinética de expresión de Delta-4 y Jagged-2 en DCs derivadas de ratones C57BL/6. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron activadas con LPS (100 ng/ml) o CT (1µg/ml) por diferentes tiempos. La expresión relativa de Delta-4 (A) y Jagged-2 (B) fue analizada mediante PCR en tiempo real y se comparó con células no tratadas (NT).

3.3 Delta-4 y Jagged-2 se inducen diferencialmente con distintos estímulos en células dendríticas.

En base a los estudios cinéticos elegimos analizar la expresión de Delta-4 y Jagged-2 en DCs tratadas con diversos estímulos a las 12 horas de tratamiento, que representa el máximo de inducción. Puesto que nuestro objetivo era correlacionar la expresión de los ligandos de Notch con la polarización de la respuesta inmune, elegimos estímulos Th1 (LPS y CpG) y estímulos Th2 (CT y PGE2). La descripción de estos estímulos y sus receptores se encuentra en la Tabla 1. Adicionalmente analizamos el efecto de estos estímulos en DCs diferenciadas en presencia o ausencia de IL-4.

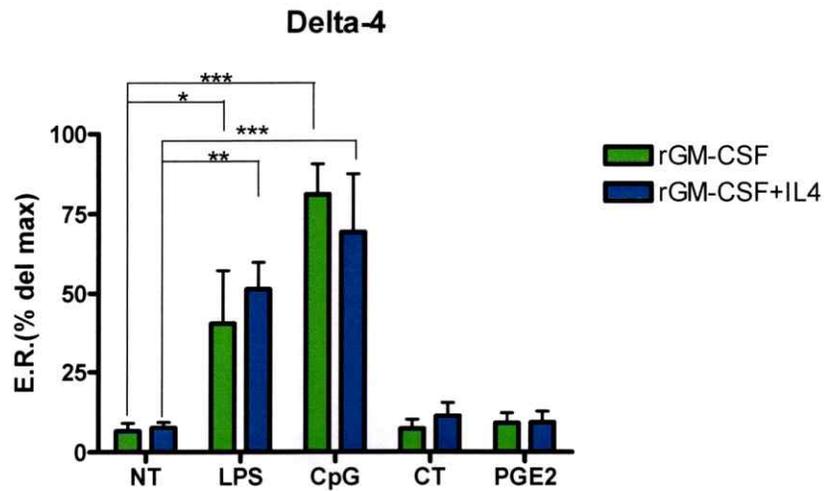
En primer lugar observamos que las DCs no tratadas generadas de ratones C57BL/6 expresan basalmente Delta-4 y Jagged-2, puesto que en todos los experimentos fue posible observar amplicones para ambos genes. La presencia de IL-4 durante la generación de las DCs no afecta la expresión basal de ambos ligandos (Fig. 4). Las DCs activadas con LPS o CpG indujeron Delta-4 independientemente de la presencia de IL-4, y este efecto fue notablemente mayor con CpG (Fig. 4A). Por otra parte, tanto CT como PGE2 no produjeron un aumento significativo en la expresión de Delta-4.

Al analizar la expresión de Jagged-2 en las DCs, notamos que este ligando no se induce bajo ninguno de los estímulos utilizados cuando las DCs son generadas y activadas en ausencia de IL-4. Sin embargo, las DCs generadas en presencia de IL-4 inducen un aumento significativo de Jagged-2 al estimular con CT. El tratamiento con PGE2 también indujo un aumento de la expresión relativa de Jagged-2 en todos los experimentos pero no fue estadísticamente significativo.

Tabla 1. Descripción de los diferentes estímulos utilizados en BMDC.

Estímulo	Sigla	Origen	Receptor conocido en células eucariontes
Lipopolisacárido	LPS	Componente de membrana de bacterias gram (-)	Receptor tipo Toll 4 (TLR4), extracelular
Toxina del cólera	CT	Enterotoxina producida por la bacteria gram (-) <i>Vibrio cholerae</i>	Monosialoganglósido1 (GM1), extracelular
Oligodeoxinucleótido CpG	CpG-ODN	Molécula sintética similar a DNA bacterial desmetilado	Receptor tipo Toll 9 (TLR9), intracelular
Prostaglandina E2	PGE2	Compuesto similar a las hormonas producido por varios tejidos en animales	Receptores EP1, EP2, EP3 y EP4, extracelular

A)



B)

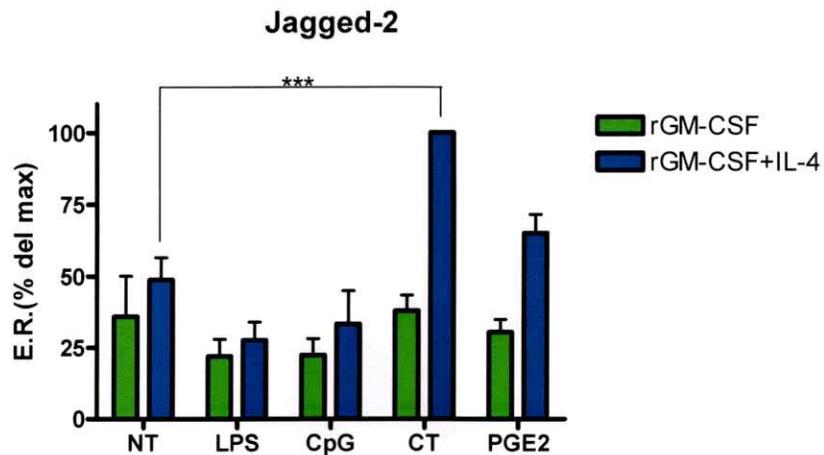
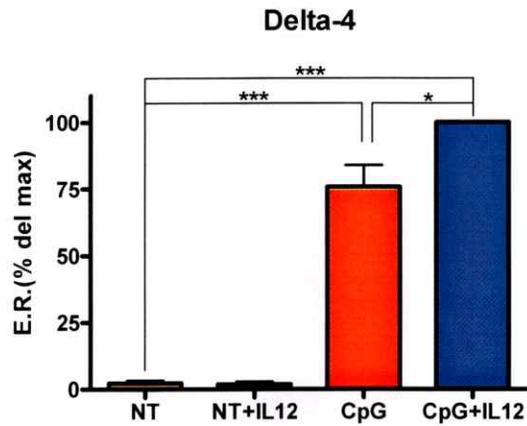


Figura 4. Expresión diferencial de Delta-4 y Jagged-2 en DCs derivadas de ratones C57BL/6. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 diferenciadas en ausencia (barras verdes) o presencia de IL-4 (barras azules), fueron activadas por 12 horas con LPS (100 ng/ml), CpG (1 µg/ml), CT (1 µg/ml) o PGE2 (1 µM). La expresión relativa del mRNA de Delta-4 (A) y Jagged-2 (B) se determinó por PCR en tiempo real. Resultado de 5 (Delta-4) y 4 (Jagged-2) experimentos independientes; $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***). Test de ANOVA con post-test de Bonferroni.

3.4 Efecto de IL-12 en la expresión de Delta-4

Como se demostró previamente (Fig. 2A), las DCs activadas por 12 horas con LPS o CpG inducen considerablemente la expresión de Delta-4. Dado que la expresión de Delta-4 en DCs aumenta en respuesta a estímulos que inducen la secreción de IL-12 (Fig. 2B) investigamos si el efecto inductor de LPS y CpG sobre Delta-4 es una consecuencia indirecta del aumento de IL-12. Para esto las DCs generadas y activadas en presencia de IL-4, fueron tratadas con IL-12 en presencia o ausencia de CpG dado que éste estímulo presentó el efecto más potente en la inducción de Delta-4. Como se observa en la figura 5A, IL-12 por si sola no es capaz de inducir Delta-4 en DCs siendo la expresión relativa equivalente a la condición no tratada. Sin embargo, al agregar IL-12 junto a CpG, la expresión relativa de Delta-4 fue significativamente mayor respecto al estímulo sólo. Para verificar si el efecto es específico para Delta-4, se evaluó Jagged-2 bajo los mismos tratamientos. En la Fig. 5B es posible observar que Jagged-2 tampoco es inducido por IL-12 y por otro lado, CpG disminuye los niveles de expresión de Jagged-2.

A)



B)

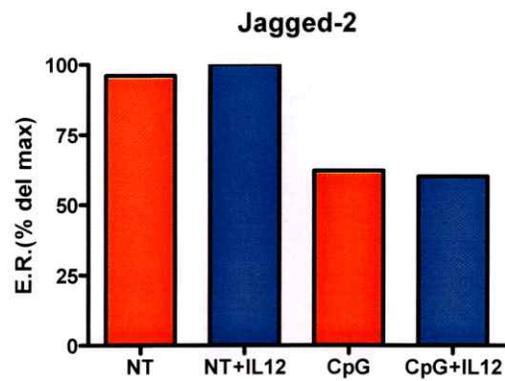


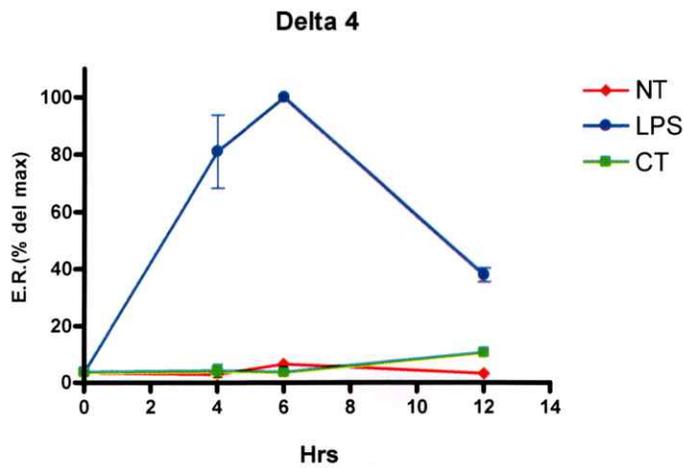
Figura 5. IL-12 actúa en sinergia con CpG en la inducción de Delta-4. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron activadas por 6 horas con CpG (1 μ g/ml) en ausencia o presencia de IL-12 (10 ng/ml). La expresión relativa del mRNA de Delta-4 (A) y Jagged-2 (B) se determinó por PCR en tiempo real. Resultados de 3 experimentos independientes (A) y un experimento (B), $p < 0.05$ (*); $p < 0.001$ (***) Test de ANOVA con post-test de Bonferroni.

3.5 Expresión de Delta-4 y Jagged-2 en DCs de ratones BALB/c

En la literatura se ha demostrado que las cepas de ratones C57/BL6 y BALB/c tienen tendencia a producir preferentemente respuestas Th1 o Th2 respectivamente. Puesto que el objetivo de este trabajo es investigar si existe correlación entre la expresión de ligandos de Notch y la polarización de la respuesta inmune, decidimos realizar un experimento indagatorio para evaluar la expresión de Delta-4 y Jagged-2 en ratones BALB/c. Las condiciones de activación fueron las mismas que en ratones C57BL/6 y el análisis se hizo por PCR en tiempo real. En la Fig. 6A se muestra que DCs generadas y activadas en presencia de IL-4, inducen Delta-4 en respuesta a LPS, con un máximo de expresión a las 6 horas, aunque las diferencias de expresión entre ambos estímulos (LPS y CT) son claras aún a las 12 horas. La expresión de Jagged-2, a diferencia de Delta-4, aumenta en respuesta a CT y el máximo de inducción se observa a las 6 horas de activación y se mantiene hasta las 12 horas. Enseguida se compararon DCs generadas en presencia o ausencia de IL-4, las cuales se estimularon además con CpG y PGE2 durante 12 horas (Fig. 7). En el caso de Delta-4, CpG fue el estímulo que presentó un aumento considerable cuando las DCs fueron generadas en ausencia de IL-4. Por otro lado, la expresión de Jagged-2 aumentó solo en respuesta a CT en DCs diferenciadas y activadas en presencia de IL-4. En este caso, la respuesta a PGE2 fue comparable a la condición no tratada.

En resumen estos resultados sugieren que existen diferencias importantes en cuanto a la expresión de Delta-4 y Jagged-2 dependiendo del fondo genético de los ratones que se están analizando. En el caso de ratones BALB/c la expresión de estas moléculas es sensible a la presencia de IL-4

A)



B)

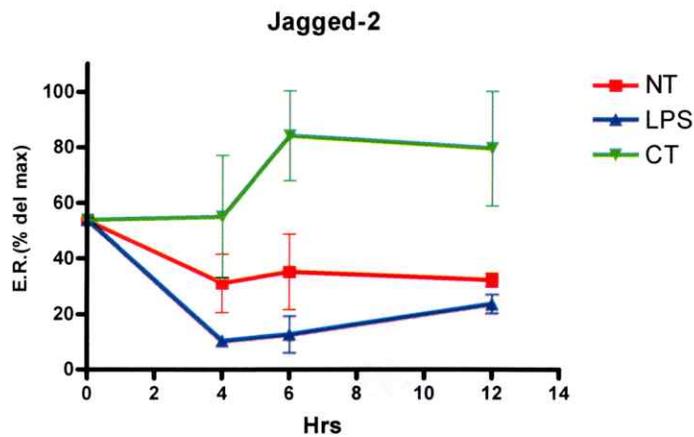


Figura 6. Cinética de expresión de Delta-4 y Jagged-2 en DCs derivadas de ratones BALB/c. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones Balb/c fueron activadas con LPS (100 ng/ml) o CT (1µg/ml) por diferentes tiempos. La expresión relativa de Delta-4 (A) y Jagged-2 (B) fue analizada mediante PCR en tiempo real y se comparó con células no tratadas (NT). Resultado de 2 experimentos independientes.

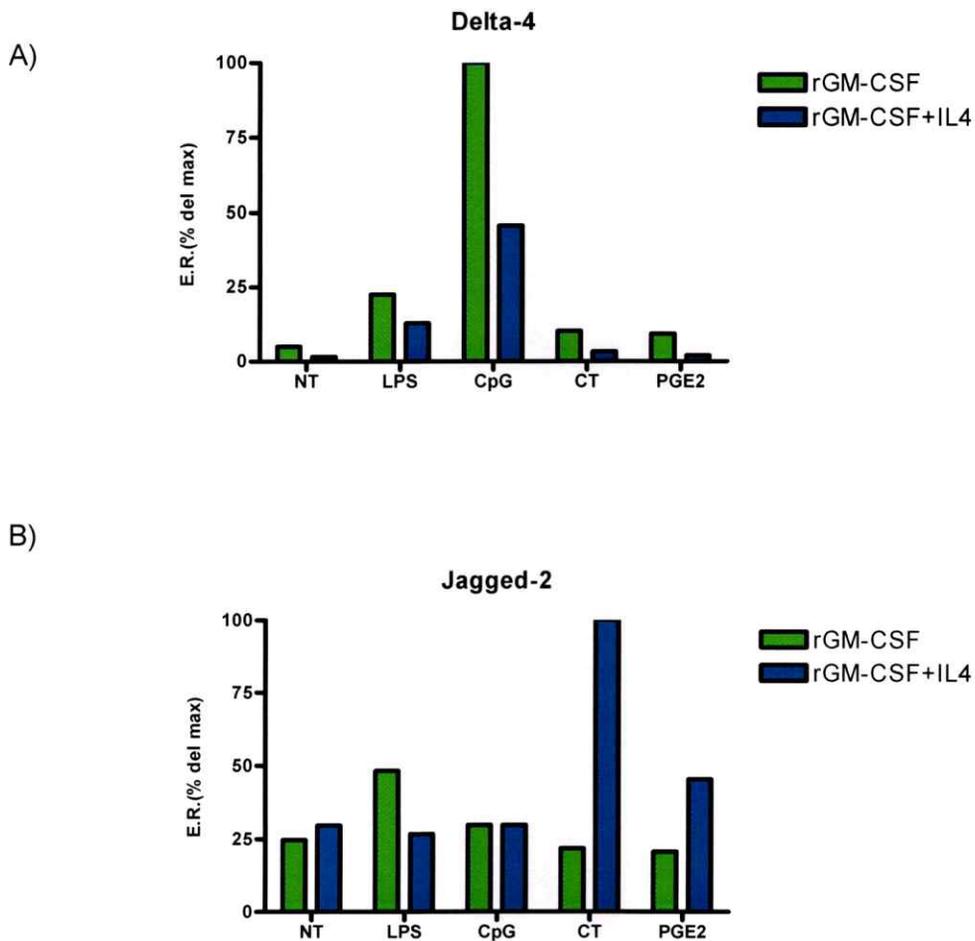


Figura 7. Expresión diferencial de Delta-4 y Jagged-2 en DCs derivadas de ratones BALB/c. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones Balb/c diferenciadas en ausencia (barras verdes) o presencia de IL-4 (barras azules), fueron activadas por 12 horas con LPS (100 ng/ml), CpG (1 μ g/ml), CT (1 μ g/ml) o PGE2 (1 μ M). La expresión relativa del mRNA de Delta-4 (A) y Jagged-2 (B) se determinó por PCR en tiempo real. (n=1)

3.6 Expresión de Delta-4 en linfocitos T activados y en BMDC activadas vía CD40

La señalización mediada por el receptor Notch ha sido principalmente estudiada en LT, donde se ha demostrado que juega un rol importante tanto en el desarrollo de los LT (Allman, 2002) como en su activación (Eagar, 2004). Sin embargo Delta-4 y Jagged-2 también han sido encontrados en LT (Singh N, 2000) y puesto que las DCs pueden expresar Notch, nos pareció interesante evaluar Delta-4 en LT activados (Th1 y Th2) y comparar su expresión con la de DCs.

La expresión de Delta-4, en linfocitos activados policlonalmente y diferenciados por medio de citoquinas a Th1 o Th2 (ver Mat. Y Met.) fue comparable al nivel de expresión basal de DC no tratadas (Fig. 8). Por otro lado, determinamos la expresión de Delta-4 en DC estimuladas con un anticuerpo anti-CD40, de manera a imitar la interacción CD40-CD40L que ocurre entre las DCs y linfocitos T CD4+. Interesantemente, Delta-4 se indujo considerablemente en DCs tratadas con anti-CD40, incluso en mayor magnitud comparado con un estímulo mediado por TLR-4 como LPS (Fig. 8).

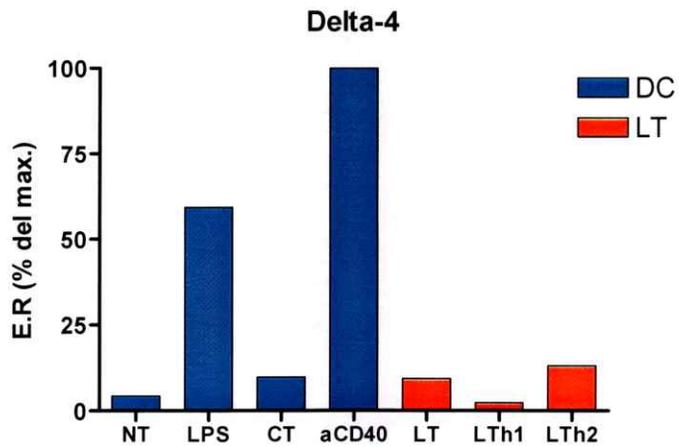


Figura 8. Delta-4 se induce en células dendríticas tratadas con anti-CD40. Células dendríticas activadas por 6 horas con LPS (100 ng/ml), CT (1 µg/ml) o un anticuerpo anti-CD40 (10 µg/ml) y diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+ activados se analizaron mediante PCR en tiempo real para determinar la expresión del mRNA de Delta-4. LT: Linfocitos T activados, LTh1(2): Linfocitos T helper 1(2). (n =1).

4. DISCUSIÓN

La vía de señalización Notch se gatilla por la interacción de uno de los 4 receptores Notch descritos (Notch1-4) con alguno de los cinco ligandos correspondientes, a saber Delta-1, Delta-3, Delta-4, Jagged-1 o Jagged-2. Estos últimos se expresan en una gran variedad de poblaciones celulares presentes en eventos de diferenciación. La polarización de la respuesta inmune, corresponde a un proceso de diferenciación tardío donde LT CD4⁺ sufren cambios de expresión génica que los transforman en células con características bien definidas, como el patrón de secreción de citoquinas. Por otro lado, está ampliamente demostrado que las células dendríticas, en función de la naturaleza del estímulo o patógeno encontrado, controlan la polarización de los linfocitos T CD4⁺ a Th1 o Th2 (Kapsenberg, 2003).

Se ha descrito que las DCs expresan todos los ligandos de Notch descritos con excepción de Delta-3 (Yamaguchi y col, 2002) y que además, estos ligandos interactúan en la interface DC:LT con sus receptores, Notch 1 y Notch 2 expresados en el LT CD4⁺. De manera que es altamente probable que durante la sinápsis inmunológica, esta vía de señalización juegue un rol en la polarización de los LT CD4⁺. En este contexto, el presente trabajo se enfoca en investigar la expresión de los ligandos de Notch en las DCs a manera de entender si estos ligandos participan en la instrucción de los LT CD4⁺ en el curso de una respuesta inmune adaptable.

Si bien las DC expresan basalmente los ligandos de Notch, se ha descrito en la literatura (Amsen y col, 2004) y se demuestra en este trabajo que la expresión de los ligandos Delta-4 y Jagged-2 aumentan diferencialmente dependiendo del tipo de estímulo sentido por la DC. En el caso de moléculas promotoras de respuestas Th1, se inducen ligandos de la familia Delta; en cambio con promotores Th2 se induce en

particular Jagged-2 (Amsen et al, 2004). Esto concuerda con un posible rol de Delta-4 y Jagged-2 en la generación de respuestas Th1 y Th2 respectivamente.

IL-4 es una citoquina muy relacionada con la polarización de la respuesta inmune actuando tanto sobre las DC como sobre los LT. Uno de los dogmas de la inmunología establece que la activación de los LT en presencia de IL-4 produce respuestas Th2. Sin embargo, se ha descrito que DC diferenciadas en presencia de IL-4 favorecerían respuestas Th1 puesto que IL-4 inhibe la producción de IL-10 a la vez que favorece la producción de IL-12 por las DCs en respuesta a algún estímulo patogénico (Figura 2; Sauma y col, 2004; Yao y col, 2005). En este escenario, el desarrollo de una respuesta Th1 puede depender tanto de la presencia de IL-4 durante la diferenciación de la DC, como del estímulo sentido por un determinado TLR. En este trabajo demostramos que Delta-4 es inducido principalmente por estímulos Th1 como LPS y CpG, además que la inducción de Delta-4 es independiente de IL-4 por lo tanto jugaría un rol importante como inductor Th1. En acuerdo con nuestros resultados, Skokos et al (2006) publicaron que Delta-4 (además de Delta-1) e IL-12 tienen un efecto redundante sobre LT CD4⁺ y cuantificaron la contribución relativa en la inducción de respuestas Th1 en 10-15% por efecto de la señalización mediada por Delta y 85-90% por efecto de IL-12, en base al porcentaje de LT CD4⁺ productores de IFN- γ que se generaban con ambas vías.

Por otra parte, el inicio de respuestas Th2 es un tema más controversial. Este tipo de respuesta ocurre cuando la DC capta componentes de parásitos pluricelulares, toxina del cólera o PGE2. A pesar que la mayoría de los receptores para estos estímulos están identificados, las moléculas que gatillarían respuestas Th2 no lo están. El principal factor soluble involucrado en diferenciación Th2 es IL-4, la cual es producida por los propios LTh2. Se ha postulado que las respuestas Th2 ocurren *por*

defecto, es decir en ausencia de inductores Th1 (Moser y Murphy, 2000). Tal como se mencionó, IL-4 es la citoquina asociada a respuestas Th2 aunque se ha descrito que las DCs pueden desarrollar respuestas Th2 en ausencia de señalización mediada por IL-4 (Jankovic y col, 2000). Amsen y col (2004) y Tanigaky y col (2004) propusieron que la vía Notch podría ser una respuesta a este problema, donde Jagged jugaría el rol central. Estos autores demostraron que la DC previo aumento de la expresión de este ligando es capaz de producir respuestas Th2 de manera independiente de IL-4.

Los resultados del presente trabajo en principio no estarían de acuerdo con esta aseveración, puesto que la expresión de Jagged-2 aumenta sólo en DCs diferenciadas y activadas en presencia de IL-4. Sin embargo, esta discordancia no es categórica puesto que los resultados mostrados no permiten atribuir el efecto de IL-4 en la inducción de Jagged-2 a la *diferenciación* o la *activación* de la DC. En el primer caso Jagged-2 sí podría ser un factor importante en el **inicio** de respuestas Th2 puesto que la inducción de Jagged-2 ocurriría recién entre 6 y 12 horas después del reconocimiento antigénico, periodo muy corto para que exista una respuesta previa Th2 que supla de IL-4 al sistema (figuras 3 y 6). En este caso, la IL-4 necesaria en la diferenciación de la DC la podrían suplir poblaciones de la médula ósea probablemente en respuesta a señalización por Jagged-1 ya que este ligando es ampliamente expresado en células estromales de médula ósea (Cheng y col, 2007). Además zonas reguladoras del locus *il-4* presentan zonas de unión a RBP-j, importante intermediario de la señalización Notch (Amsen y col, 2004). En el segundo caso (efecto de IL-4 en la DC sólo durante la activación), Jagged-2 cumpliría el rol de estabilizador o potenciador de una respuesta Th2 previamente iniciada ya que la IL-4 necesaria para la inducción de Jagged-2 en este caso sólo podría provenir (según lo reportado en la literatura) de otros LTh2 (Mosmann y Coffman, 1989).

Un dato interesante surgido de este trabajo y del cual no existen reportes radica en el aumento importante de la expresión de Delta-4 en la DC cuando se estimula con el ligando de la proteína CD40, expresada en DCs. Este hecho sugiere que la propia sinápsis inmunológica reestimula la señalización vía Notch y por ende, la comunicación mediada por Notch entre la DC y el LT CD4⁺ sería bidireccional.

Otro dato importante, es que la señalización mediada por Delta o Jagged, además de gatillarse con estímulos diferentes, son recíprocamente inhibitorias. Sun y Pearce (2007) demostraron que DCs tratadas con estímulos TLR suprimen el direccionamiento hacia respuestas Th2 al inhibir la producción temprana de IL-4 por LTh independientemente del efecto de IL-12 e IFN- γ . Un año más tarde demostró que esto estaba mediado por un aumento de la expresión de Delta-1 y Delta-4 en la DC (Sun y col, 2008).

Los datos presentados en este trabajo dan información de la expresión génica de los ligandos de Notch a nivel transcripcional. Por lo tanto sería importante demostrar la temporalidad de la expresión de ambos ligandos a nivel traduccional, complementando estos datos con experimentos de western blot o inmunofluorescencia por citometría de flujo. Para esto es necesario contar con buenos anticuerpos comerciales.

Finalmente, en este trabajo se demostró que la expresión diferencial de los ligandos de Notch en las DCs ocurre según el tipo de estímulo sentido y depende parcialmente de IL-4 (en el caso de Jagged-2). Por otra parte, la inducción génica selectiva de un ligando particular en la DC podría contribuir a promover una respuesta inmune Th1/Th2 apropiada según la naturaleza del patógeno.

5. CONCLUSIONES

- En ratones C57BL/6, Delta-4 es inducido en células dendríticas expuestas a estímulos que gatillan respuestas Th1 como LPS y CpG.
- En este mismo fondo genético, Jagged-2 es inducido en células dendríticas frente a estímulos Th2 como toxina del cólera y prostaglandina E2.
- La inducción de Delta-4 en DCs es independiente de IL-4, en cambio la inducción de Jagged-2 ocurre de manera dependiente de IL-4 durante la diferenciación y activación de la DC.
- IL-12 por si sola no es capaz de inducir la expresión de Delta-4, aunque presenta un efecto sinérgico en respuesta a CpG.
- CD40L induciría la expresión de Delta-4 en DCs de ratones C57BL/6 sugiriendo que el propio contacto entre DCs y LT CD4+ podrían activar la vía Notch potenciando la respuesta inmune.

6. REFERENCIAS

Agarwal, S., Rao, A. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T-cell differentiation. Immunity. **9**: 965-975.

Allman, D., Punt, J., Izon, D., Aster, J., Pear, W. (2002). An invitation to T and more: Notch signaling in lymphopoiesis. Cell. **101**: S1-S11.

Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., Flavell, A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different Notch ligands on antigen-presenting cells. Cell. **117**: 515-526.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science. **284**: 770-776.

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

Banchereau, J. and Steinman, R. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature. **392**: 245-252.

Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinhieri, G., Liu, Y., O'Garra, A. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential Toll-like receptor ligation. J. Exp. Med. **197**: 101-109.

Cheng, P., Nefedova, Y., Corso, C., Gabrilovich, D. (2007). Regulation of dendritic cell differentiation by bone marrow stroma via different Notch ligands. Blood. **109**: 507-515.

Eagar, T., Tang, Q., Wolfe, M. He, Y., Pear, W., Bluestone, J. (2004). Notch1 signaling regulates peripheral T cell activation. Immunity. **20**: 407-415.

Grogan, J., Mohrs, M., Harmon, B., Lacy, D., Sedat, J., Locksley, R. (2001). Early transcription and silencing of cytokine gene underlie polarization of T helper cell subsets. Immunity. **14(3)**: 205-215.3

Hamada, Y., Kadokawa, Y., Okabe, M., Ikawa, M., Coleman, J.R., Tsujimoto, Y. (1999). Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 genes induce early embryonic lethality. Development. **126**: 3415-3424.

Huppert, S.S., Le, A., Schroeter, E.H., Mumm, J.S., Saxena, M.T., Milner, L.A., Kopan, R. (2000). Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. Nature. **405**: 966-970.

Iwazaki, A., Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of adaptive immune responses. Nat. Immunol. **5**: 987-995.

Jankovic, D. Kullberg, M.C., Hieny, S., Caspar, P., Collazo, C.M., Sher, A. (2002). In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in a IL-10 (-/-) setting. Immunity. **16**: 429-439.

Jankovic, D. Kullberg, Noben-Trauth, N., Caspar, P., Paul, W.E., Sher, A. (2000). Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. J. Immunol. **164**: 3047-3055.

Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nat. Rev. Immunol. **3**: 984-993.

Kato, H. Taniguchi, Y., Kurooka, H, Minoguchi, S. (1997). Involvement of RBP-j in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. Development. **124**: 4133-4141.

Maillard, I., Adler, S.H., Pear, W. (2003). Notch and the immune system. Immunity. **19**: 781-791.

Minter, L., Turley, D., Das, P., Shin, H., Joshi, I., Lawlor, R., Cho, O., Palaga, T., Gottipati, S., Telfer, J., Kostura, L., Fauq, A., Simpson, K., Such, K., Miele, L., Golde, T., Miller, S., Osborne, B. (2005). Inhibitors of γ -secretase block *in vivo* and *in vitro* T helper 1, polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. Nat. Immunol. **6**: 680-688.

Morgan, T.H. (1917). The theory of the gene. Am. Nat. **51**: 513-544.

Mosmann, T.R., Coffman, R. (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann. Rev. Immunol. **7**: 145-173.

Moser, M., Murphy, K.M. (2000). Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. Nat. Immunol. **1**: 199-205

Mowen, K.A., Glimcher, L.H. (2004). Signaling pathways in Th2 development. Immunol. Rev. **202**: 203-222.

Murphy, K.M., Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. Nat. Rev. Immunol. **2**: 933-944.

Noben-Trauth, N., Shultz, L., Brombacher, F., Urban, J., Gu, H., Paul, W. (1997). An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. PNAS. **94** (20):10838-10843.

Osborne, B., Minter, L. (2007). Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. Nature. **7**: 64-75.

Pui, J., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Pear, W. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influence B versus T lineage determination. Immunity. **11**: 299-308.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M. (1999). Deficient T-cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. Immunity. **10**: 547-558.

Reis e Sousa, C. Hieny, S. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution in T-cell areas. J. Exp. Med. **186**: 1819-1829.

Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C., Qin, S., Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. Eur. J. Immunol. **28**: 2760-2769.

Sauma, D., Michea, P., Lennon-Dumenil, A.M., Fierro, A., Morales, J. Roseblatt, M., Bono, M.R. (2004). Interleukin-4 selectively inhibits interleukin-2 secretion by lipopolysaccharide-activated dendritic cell. Scand. J. Immunol. **59**: 183-189.

Schijns, V.E., Haagmans, B.L., Wierda, C.M., Kruithof, B., Hiejnen, I.A., Alber, G., Horzinek, M.C. (1998). Mice lacking IL-12 develop polarized Th1 cells during viral infection. J. Immunol. **160**: 3958-3964.

Singh, N., Phillips, R.A., Iscove, N., Egan, S. (2000). Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. Exp. Hematol. **28**: 527-534.

Kalinski, P., Hilkens, C., Snijders, A., Kapsenberg, M. (1997). Interleukin-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. J. Immunol. **159**: 28-35.

Skokos, D., Nussenzweig, M. (2006). CD8(-) DCs induce interleukin-12-independent Th1 differentiation through Delta-4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS. J. Exp. Med. **204**: 1525-1531.

Sun, J., Krawczyk, J., Pearce, E. (2008). Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4. J. Immunol. **180**: 1655-1661.

Sun, J., Pearce, E. (2007). Suppression of early IL-4 production underlies the failure of CD4 T cells activated by TLR-stimulated dendritic cells to differentiate into Th2 cells. J. Immunol. **178**: 1635-1644.

Tanaka, S., Tsukada, J., Suzuki, W., Hayashi, K., Tanigaki, K., Tsuji, M., Kubo, M. (2006). The interleukin-4 enhancer CNS-2 is regulated by Notch signals and controls initial expression in NKT cells and memory-type CD4 T cells. Immunity. **24**: 689-701.

Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, H., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., Honjo, T. (2004). Regulation of $\alpha\beta/\gamma\delta$ T cell lineage commitment and Peripherals T cell responses by Notch/RBP-j signaling. Immunity. **20**: 611-622.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol. **3**: 143-146.

Wilson, A., MacDonald, H.R., Radtke, F. (2001). Notch1 deficient common lymphoid precursors adopt a B-cell fate in thymus. J. Exp. Med. **194**: 1003-1012.

Tu, L., Fang, T., Artis, D., Shestova, O., Pross, S., Maillard, I., Pear, M. (2005). Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. J. Exp. Med. **202**: 1037-1042

Yamaguchi, E., Chiba, S., Kumano, K., Kunisato, A., Takahashi, T., Hirai, H. (2002). Expression of Notch ligands Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. Immunol. Lett. **81**: 59-64

Yao, Y., Li, W., Kaplan, M., Chang, Ch. (2005). Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. J. Exp. Med. **201**: 1899-1903.