

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO MODULADOR DE LOS LIGANDOS Wnt EN LA  
DIFERENCIACIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS  
HUMANAS

TESIS DOCTORAL DE:

**JARIS VALENCIA MAHÓN**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**ROSA SACEDÓN AYUSO  
ALBERTO VARAS FAJARDO**

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Biología



**Efecto modulador de los ligandos Wnt en la  
diferenciación y función de las células  
dendríticas humanas**

TESIS DOCTORAL

*Jaris Valencia Mahón*

2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Biología**

**Efecto modulador de los ligandos Wnt en la  
diferenciación y función de las células  
dendríticas humanas**

*Jaris Valencia Mahón*

**Dña. Rosa Sacedón Ayuso**, Profesor Titular de Universidad  
Departamento de Biología Celular  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid

y

**D. Alberto Varas Fajardo**, Profesor Titular de Universidad  
Departamento de Biología Celular  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid

Certifican que Dña. Jaris Valencia Mahón, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, el trabajo titulado: “Efecto modulador de los ligandos Wnt en la diferenciación y función de las células dendríticas humanas”, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Inmunología.

VºBº de los DIRECTORES

El interesado

Fdo. Rosa Sacedón Ayuso    Fdo. Alberto Varas Fajardo

Jaris Valencia Mahón

## ABREVIATURAS

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>ADN</b>            | Ácido desoxirribonucleico  |
| <b>ADNc</b>           | ADN complementario   |
| <b>APC</b>            | Aloficocianina   |
| <b>ARNm</b>           | Ácido ribonucleico mensajero   |
| <b>BDCA2</b>          | Antígeno 2 de las células dendríticas de sangre ( <i>Blood DC Antigen 2</i> ) /<br>CD303     |
| <b>CamKII</b>         | Calcio calmodulina quinasa II  |
| <b>cDCs</b>           | Células dendríticas convencionales   |
| <b>CDP</b>            | Precursor común de células dendríticas   |
| <b>CK59</b>           | (2-(2-Hidroxietilamino)-6-aminohexilcarbamato de terbutilo-9-<br>isopropilpurina)            |
| <b>CTRL</b>           | Control  |
| <b>CTRL-DCs</b>       | Células dendríticas diferenciadas en condiciones control                                     |
| <b>CTRL-iDCs</b>      | Células dendríticas inmaduras no tratadas  |
| <b>CTRL-maDCs</b>     | Células dendríticas maduras no tratadas  |
| <b>CTRL-siRNA-DCs</b> | Células dendríticas transfectadas con el siRNA control                                       |
| <b>DAMPs</b>          | Patrones moleculares asociados a peligro ( <i>Danger-Associated<br/>Molecular Patterns</i> ) |
| <b>DCs</b>            | Células dendríticas  |
| <b>Dsv</b>            | Disheveled   |
| <b>FITC</b>           | Isotiocianato de fluoresceína  |
| <b>Fc</b>             | Fracción constante de las inmunoglobulinas   |
| <b>Fzd</b>            | Frizzled   |
| <b>Go6983</b>         | ([2-[1-(3-dimetilaminopropilo)-5-metoxiindol-3-il]-3-(1H-indol-3-l)<br>maleimida])           |
| <b>GM-CSF</b>         | Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago   |
| <b>GSK3</b>           | Glucógeno sintetasa quinasa 3  |
| <b>HLA</b>            | Antígeno leucocitario humano   |
| <b>HSC</b>            | Célula madre hematopoyética ( <i>Hematopoietic Stem Cell</i> )                               |
| <b>iDCs</b>           | Células dendríticas inmaduras  |
| <b>IFN</b>            | Interferón   |
| <b>IL-12</b>          | Interleuquina-12   |

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>IMF</b>             | Intensidad media de fluorescencia  |
| <b>IRFs</b>            | Factores reguladores de interferón   |
| <b>IP</b>              | Ioduro de propidio   |
| <b>LCs</b>             | Células de Langerhans  |
| <b>LEF</b>             | Factor que se une al potenciador de linfocitos ( <i>Lymphocyte Enhancer-binding Factor</i> )                                       |
| <b>LPS-DCs</b>         | Células dendríticas estimuladas con LPS  |
| <b>LRP</b>             | Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad ( <i>Low-density-lipoprotein Receptor-related Protein</i> ) |
| <b>maDCs</b>           | Células dendríticas maduras  |
| <b>MDP</b>             | Progenitor común de macrófagos y células dendríticas ( <i>Macrophage and Dendritic cell common precursor</i> )                     |
| <b>MHC</b>             | Complejo principal de histocompatibilidad  |
| <b>MLR</b>             | Reacción linfocitaria mixta  |
| <b>Mo</b>              | Monocito   |
| <b>moDCs</b>           | Células dendríticas derivadas de monocitos   |
| <b>NK</b>              | Célula <i>Natural killer</i>   |
| <b>PAMPs</b>           | Patrones Moleculares Asociados a Patógenos ( <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> )  |
| <b>PCR</b>             | Reacción en Cadena de la Polimerasa  |
| <b>PCRq</b>            | PCR cuantitativa   |
| <b>pDCs</b>            | Células dendríticas plasmacitoides   |
| <b>PCP</b>             | Polaridad celular planar ( <i>Planar Cell Polarity</i> )   |
| <b>PE</b>              | Ficoeritrina   |
| <b>PE-Cy5</b>          | Tándem Ficoeritrina+cianina 5  |
| <b>Pre-Wnt5a-maDCs</b> | Células dendríticas tratadas con Wnt5a antes de su maduración  |
| <b>PRRs</b>            | Receptores de Reconocimiento de Patrones moleculares ( <i>Pattern Recognition Receptors</i> )                                      |
| <b>SFB</b>             | Suero fetal bovino   |
| <b>siRNA</b>           | ARN pequeño de interferencia   |
| <b>SP600125</b>        | Antrapirazolona  |
| <b>TCF</b>             | Factor de células T  |
| <b>TCR</b>             | Receptor de células T  |
| <b>tDCs</b>            | Células dendríticas tolerogénicas  |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>TLR</b>             | Receptores tipo Toll ( <i>Toll-Like Receptors</i> )     |
| <b>Th1</b>             | célula T <i>helper</i> 1                                |
| <b>Treg</b>            | Linfocitos T reguladores                                |
| <b>Wnt3a-DCs</b>       | Células dendríticas diferenciadas en presencia de Wnt3a |
| <b>Wnt5a-DCs</b>       | Células dendríticas diferenciadas en presencia de Wnt5a |
| <b>Wnt5a-iDCs</b>      | Células dendríticas inmaduras tratadas con Wnt5a        |
| <b>Wnt5a-maDCs</b>     | Células dendríticas maduras tratadas con Wnt5a          |
| <b>Wnt5a-siRNA-DCs</b> | Células dendríticas transfectadas con el siRNA de Wnt5a |

# ÍNDICE

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1. CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS</b> .....   | <b>6</b>  |
| 1.1 Poblaciones de DCs.....   | 10        |
| 1.2 DCs derivadas de monocitos.....   | 13        |
| <b>2. PROTEÍNAS WNT</b> .....   | <b>16</b> |
| 2.1 Ruta Wnt canónica.....  | 17        |
| 2.2 Rutas Wnt no canónicas.....   | 19        |
| 2.3 Regulación de la señalización Wnt.....  | 21        |
| <b>3. FUNCIONES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT</b> .....                                      | <b>23</b> |
| 3.1 Wnt y hematopoyésis.....  | 23        |
| 3.2 Señalización Wnt y regulación de la respuesta inmune.....                         | 24        |
| <b>4. SEÑALIZACIÓN WNT Y DCs</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | <b>36</b> |
| 1. Generación de DCs a partir de monocitos.....                                       | 37        |
| 2. Maduración de las DCs.....   | 38        |
| 3. Silenciamiento de Wnt5a en iDCs.....   | 39        |
| 4. Aislamiento de linfocitos T CD4 <i>naive</i> .....                                 | 41        |
| 5. Reacción linfocitaria mixta (MLR).....   | 42        |
| 6. Activación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> <i>naive</i> vía CD3/CD28.....         | 42        |
| 7. PCR cuantitativa a tiempo real.....  | 42        |
| 8. Análisis fenotípico mediante citometría de flujo.....                              | 43        |
| 9. Valoración de los niveles de proteínas intracelulares por citometría de flujo..... | 44        |
| 10. Valoración de los niveles de fosforilación de proteínas intracelulares.....       | 44        |
| 11. Anticuerpos utilizados en el estudio citofluorimétrico.....                       | 44        |
| 12. Determinación de los niveles de apoptosis.....                                    | 44        |
| 13. Ensayos de proliferación.....   | 45        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 14. Cuantificación de la producción de citocinas.....   | 45        |
| 15. Detección de citocinas intracelulares por citometría de flujo .....   | 45        |
| 16. Ensayos de endocitosis.....   | 46        |
| 17. Inmunofluorescencia .....   | 46        |
| 18. Análisis estadístico.....   | 46        |
| <b>RESULTADOS.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>1. La expresión de los receptores de ligandos Wnt se regula durante el proceso de diferenciación y maduración de las moDCs.....</b>                      | <b>48</b> |
| <b>2. Wnt5a modifica la diferenciación de los monocitos hacia DCs con características tolerogénicas .....</b>   | <b>51</b> |
| 2.1 Las proteínas Wnt interfieren en la diferenciación de los monocitos humanos en DCs inmaduras .....  | 51        |
| 2.2 Las Wnt-DCs presentan alterada su capacidad para responder a estímulos TLR .....  | 55        |
| 2.3 Las Wnt5a-DCs tienen menor capacidad aloestimuladora y promueven la secreción de IL-10 por parte de los linfocito T CD4 <sup>+</sup> <i>naive</i> ..... | 60        |
| 2.4 El perfil transcripcional de las Wnt5a-DCs se correlaciona con sus alteraciones funcionales .....   | 63        |
| 2.5 Wnt5a interfiere en la señalización GM-CSF/IL-4 necesaria para la diferenciación de monocitos en DCs .....  | 66        |
| 2.6 Wnt5a modifica el programa genético de los monocitos durante las primeras etapas de su diferenciación en DCs.....                                       | 68        |
| 2.7 El efecto de Wnt5a sobre la diferenciación de las DCs se produce durante las primeras horas de cultivo .....  | 71        |
| 2.8 Los monocitos producen IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$ en respuesta a proteínas Wnt .....  | 73        |
| <b>3. El efecto de Wnt5a durante la diferenciación de las moDCs es dependiente de la señalización Wnt no canónica .....</b>                                 | <b>75</b> |
| <b>4. Wnt5a modula la maduración de las DCs y participa en su posterior función.....</b>  | <b>82</b> |
| 4.1 Wnt5a no supone un estímulo madurativo para las DCs .....   | 82        |
| 4.2 El incremento de la señal Wnt5a modifica ligeramente la respuesta de las DCs a LPS .  | 84        |

---

|  |            |
|--|------------|
| 4.3 Las DCs inmaduras expresan Wnt5a e incrementan drásticamente su producción tras estimulación .....                       | 86         |
| 4.4 Wnt5a es el principal ligando Wnt no canónico expresado por las DCs en su condición inmadura y tras su maduración.....   | 87         |
| 4.5.- Papel del Wnt5a producido por las DCs tras su estimulación .....   | 88         |
| 4.6 Los linfocitos T CD4 <i>naive</i> humanos expresan receptores para proteínas Wnt.....                                    | 91         |
| 4.7 Wnt5a induce un incremento en la producción de IFN $\gamma$ durante la activación de linfocitos T CD4 <i>naive</i> ..... | 92         |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>96</b>  |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>117</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>119</b> |
| <b>SUMMARY</b> .....   | <b>137</b> |
| Introduction .....   | 138        |
| Objective .....  | 140        |
| Material & Methods .....   | 140        |
| Results .....  | 141        |
| Conclusions .....  | 142        |
| <b>ANEXO:Publicaciones</b> .....   | <b>145</b> |

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS.**

Las células dendríticas (DCs) son una población heterogénea de células presentadoras de antígeno profesionales que regulan tanto el inicio de una respuesta inmune como la tolerancia central y periférica. Las DCs están especializadas en la captación, transporte y presentación de antígenos y por lo tanto tienen capacidad para generar repuestas inmunes específicas mediadas por linfocitos T, tanto *naive* como memoria, linfocitos B y células *natural killer* (NK) (*Reis e Sousa 2006; Palucka y Banchereau 2012*).

Las DCs inician una respuesta inmune mediante el procesamiento y la presentación de un antígeno a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T *naive* en los órganos linfoides. En los tejidos periféricos las DCs por lo general se encuentran en estado inmaduro. Estas DCs inmaduras tienen la capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos eficientemente en contexto de moléculas MHC. En su condición inmadura las DCs acumulan moléculas de MCH-II en el compartimento endosoma-lisosomal, mientras que expresan bajos niveles de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) y tienen una limitada capacidad para producir citocinas (*Trombetta y Mellman 2005; Palucka y Banchereau 2012*).

Cuando una DC inmadura en la periferia recibe una señal de maduración en forma de moléculas propias de patógenos (PAMPs) (*Joffre y col. 2009*), señal de peligro (DAMPs) (*Nace y col. 2012*) o citocinas inflamatorias, se induce su migración hacia órganos linfoides secundarios donde dará lugar a una DC madura con capacidad para inducir la diferenciación de los linfocitos T *naive* y lanzar así una respuesta inmune (*Reis e Sousa 2006*). Tradicionalmente se pensaba que las DCs maduras perdían su capacidad para captar y procesar antígenos, pero estudios más recientes demuestran que la exposición de DCs inmaduras a estímulos de maduración permite un incremento inicial y transitorio en su capacidad para captar antígenos seguido de una rápida reducción de esta función y una transición hacia el estado maduro inmunogénico (*Reis e Sousa 2006*).

Los TLR (Toll-like receptors) son los principales receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) expresados por las DCs capaces de reconocer un amplio rango de PAMPs y en algunos casos también DAMPs (*Liu y col. 2010*). Es bien conocido que la activación de los TLR inicia una cascada de señalización intracelular en las DCs que resulta en la inducción de la presentación antigénica, la producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias y el aumento en la expresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras en la superficie de estas células lo que

conlleva la inducción de una respuesta inmune adaptativa determinada (*Pasare y Medzhitov 2005; Liu y col. 2010*).

Las DCs durante su maduración incrementan la expresión en superficie de MHC y moléculas coestimuladoras, así como su capacidad para producir citocinas y adquirir CCR7, que les permite migrar hacia los ganglios linfáticos. Sin embargo, el proceso de maduración de las DCs no resulta en un fenotipo único, sino que diferentes señales inducen a las DCs a adquirir distintos fenotipos que finalmente conducen a diferentes respuestas inmunes (*Palucka y Banchereau 2012*). En una respuesta inmunogénica las DCs van a aportar tres tipos de señales a los linfocitos T *naive* que van a definir su destino, y por tanto el tipo de respuesta inmune. Por un lado, la señal a través del receptor de las células T (TCR) cuando reconoce el complejo MHC-péptido presentado por las DCs. Por otra parte, una señal de coestimulación que resulta del balance de diferentes señales a través de muchos receptores, como la unión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en las DCs con CD28 en los linfocitos T, o la unión de la molécula de adhesión ICAM-1 con LFA-1. Por último, señales producidas por las DCs y otras células que determinan la diferenciación de los linfocitos T en células efectoras. Por ejemplo como resultado de la unión de CD40 con CD40L se induce la secreción de IL-12 por parte de las DCs que promueve la diferenciación de los linfocitos T *naive* hacia Th1 (*Reis e Sousa 2006; Schmidt y col. 2012*). El tipo de célula T efectora que se origine va a estar profundamente influenciado por el patrón de citocinas que produzcan la DCs, y esto a su vez va a estar determinado, al menos en parte, por la unión de un determinado TLR a su ligando. Así para la diferenciación de los Th1 se necesitan DCs productoras de IL-12, mientras que para la polarización Th2 es necesaria la producción de IL-4. Por otra parte, las DCs productoras de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 y/o TGF $\beta$  inducen la polarización hacia Th17 (*Wan y Flavell 2009; Wan 2010*).

Por lo tanto, para que una DC induzca una respuesta inmunogénica, es decir, promueva la diferenciación de un clon de linfocitos T *naive* hacia un tipo de célula efectora en concreto y se dispare así una respuesta inmune específica, se tienen que dar las 3 señales, puesto que si por ejemplo sólo se da la señal a través de TCR se promueve la inactivación de los linfocitos T *naive* por anergia y delección, lo que a fin de cuentas, conlleva tolerancia.

Además de su función inmunogénica, las DCs están implicadas en mantener la tolerancia frente a antígenos propios así como frente a moléculas o microorganismos inocuos (*Schmidt y col. 2012*). Tolerancia es la ausencia total o inhibición parcial de una respuesta inmune adaptativa dañina. El balance entre tolerancia e inmunidad permite el ataque específico y la

consecuente eliminación de patógenos peligrosos o células cancerosas, mientras que moléculas o microorganismos inocuos y antígenos propios son ignorados (Mayer y col. 2012).

Existe una gran controversia sobre cómo las DCs regulan la tolerancia inmunológica. La visión tradicional sugería que en situación de reposo las DCs se mantienen en estado inmaduro y serían las encargadas de inducir tolerancia puesto que, aunque las DCs inmaduras procesan y presentan antígenos, en ausencia de coestimulación promueven la anergia y delección de los linfocitos T (Jonuleit y col. 2000; Lutz y col. 2000; Steinman y col. 2003; Reis e Sousa 2006; Manicassamy y Pulendran 2011). Sin embargo, durante los últimos años se han encontrado DCs con fenotipo maduro que presentan funciones reguladoras (Popov y col. 2006; von Bergwelt-Baildon y col. 2006; Popov y col. 2008). Proponiéndose así que las DCs tolerogénicas (tDCs) son un estado funcional más que una única subpoblación definida por marcadores fenotípicos (Schmidt y col. 2012). Esto sugiere una dicotomía funcional, es decir, que existen poblaciones de DC potencialmente capaces de llevar a cabo, dependiendo de las circunstancias, tanto una respuesta inmune tolerogénica como una inmunogénica. Por ejemplo, en condiciones de reposo las células de Langerhans (LCs) de la piel median la tolerancia frente a antígenos propios induciendo la proliferación de linfocitos T reguladores (Treg), mientras que durante una infección las LCs se activan e inducen la proliferación de linfocitos T efectores mediando, por tanto, una respuesta inmunogénica (Seneschal y col. 2012). Otros autores proponen, sin embargo, que en la inducción de tolerancia estarían implicadas subpoblaciones especializadas de DCs, como las DCs CD103<sup>+</sup> del intestino que juegan un papel crucial en la tolerancia frente a bacterias comensales y antígenos de la comida (del Rio y col. 2010; Scott y col. 2011; Mayer y col. 2012). Por lo tanto, la capacidad tolerogénica de las DCs puede ser inherente o adquirida por las condiciones ambientales. La gran heterogeneidad que existe entre las poblaciones de DCs con función tolerogénica puede ser debido a su plasticidad, puesto que son capaces de responder e integrar distintas señales de su microambiente, siendo éste diferente dependiendo de la localización anatómica donde se encuentren. No obstante, todas estas DCs comparten la habilidad de regular o inhibir la activación de células T y de inducir o promover el desarrollo y expansión de linfocitos Treg. (Schmidt y col. 2012).

Se han descrito diversos factores solubles anti-inflamatorios como IL-10, TGF- $\beta$  o PGE<sub>2</sub> que dirigen la diferenciación de las tDCs tanto *in vivo* como *in vitro* (Popov y col. 2008). *In vivo* estos factores juegan un papel importante en estado estacionario para mantener la integridad de muchos órganos, particularmente aquellos que están en contacto continuo con el exterior como

los pulmones o el intestino. Por ejemplo las células epiteliales del intestino producen TGF $\beta$  que promueve la generación de tDCs y éstas, a su vez, la de células Treg (*Iliev y col. 2009*). Por otra parte, muchos patógenos y tumores pueden producir estos factores tolerogénicos como mecanismo de escape del sistema inmune. *In vitro* se puede inducir la generación de tDCs usando moléculas biológicas, agentes farmacológicos o por modificación genética. Dentro de los factores biológicos más utilizados están, como hemos dicho antes, la IL-10 y el TGF $\beta$ , pero también la vitamina D<sub>3</sub>, el péptido vasoactivo intestinal, estrógenos, incluso anticuerpos o ligandos solubles como el HLA-G (*Maldonado y von Andrian 2010*).

En general las tDCs presentan un estado de maduración incompleto que se define por bajos niveles de expresión de MHC-II, moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y CCR7. Sin embargo, tienen una mayor capacidad para captar antígenos. Asimismo son incapaces de producir citocinas pro-inflamatorias, como IL-12 y TNF $\alpha$ , mientras que tienen mayor capacidad para secretar IL-10. Todo esto hace que las tDC puedan producir anergia y supresión de las células T y la generación de linfocitos Treg (*Maldonado y von Andrian 2010; Mayer y col. 2012; Schmidt y col. 2012*).

Como hemos comentado anteriormente, las DCs están implicadas en el mantenimiento de la tolerancia central y periférica. Respecto a la tolerancia central, la DCs tímicas que se encuentran en la médula o en el límite córtico-medular participan en la eliminación de linfocitos T autoreactivos, proceso conocido como selección negativa (Brocker 1997) así como en el desarrollo de linfocitos Treg naturales (nTreg) (*Mayer y col. 2012*). Respecto a la tolerancia periférica las DCs participan mediante diferentes mecanismos. El más importante es la generación de nuevos linfocitos Treg inducibles (iTreg) así como el mantenimiento y la activación de los diferentes linfocitos Treg. Por otra parte, las DCs participan en la tolerancia periférica promoviendo la delección clonal de linfocitos T no reguladores mediante inducción de muerte celular mediada por activación o bien induciendo la anergia clonal lo que conlleva la inactivación funcional de los linfocitos T. Asimismo, existen numerosos mecanismos, como la producción de moléculas inmnomoduladoras y factores inmunosupresores, que resultan en un ciclo de retroalimentación entre las DCs y los Treg que ayudan a mantener la tolerancia periférica (*Ezzelarab y Thomson 2011; Mayer y col. 2012*).

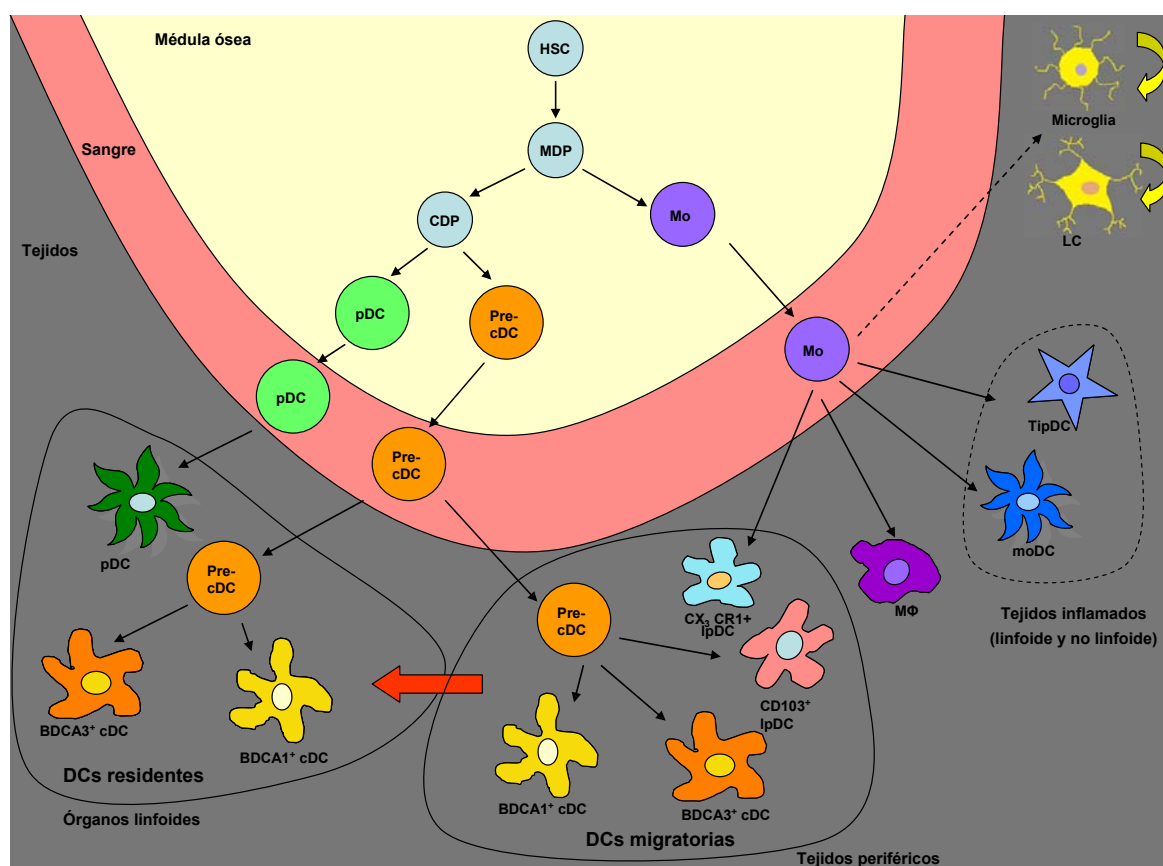
## 1.1 Poblaciones de DCs

Las diferentes funciones de las DCs son llevadas a cabo por diferentes subpoblaciones que, gracias a su plasticidad, reaccionan y se adaptan a las condiciones del entorno en el que se encuentran. Las DCs se pueden clasificar en función de diferentes criterios. Según su localización, se dividen en migratorias, residentes o circulantes. Las DCs migratorias terminan su proceso de diferenciación en los tejidos periféricos y migran hacia los órganos linfoides cuando maduran en respuesta a un estímulo. Sin embargo, las DCs residentes finalizan su diferenciación en los órganos linfoides y se mantienen en ellos durante su ciclo de vida. Allí reciben los antígenos o bien a través de la linfa o bien a través de las DCs migratorias. Así en los ganglios linfáticos podemos encontrar tanto DCs residentes como migratorias, mientras que en el bazo sólo encontramos DCs residentes. Las DCs que se encuentran circulando por la sangre son las DCs circulantes, que hasta el momento sólo han sido descritas en humanos (Naik 2008). Otro criterio utilizado para clasificar a las DCs es si aparecen en situación estacionaria o si por el contrario sólo aparecen durante procesos infecciosos o de inflamación, estas últimas son las denominadas DCs inflamatorias. Por último clasificamos a las DCs según el progenitor celular del que se originen. Todas las DCs proceden de un progenitor mieloide de la médula ósea con potencial para dar lugar a monocitos, macrófagos y DCs (MDP) pero que ha perdido la capacidad para dar lugar granulocitos o cualquier otro tipo celular de linaje mieloide. A partir de este MDP se obtienen dos tipos celulares diferentes con capacidad para originar DCs: el precursor común de DCs (CDP) y los monocitos (Esquema 1) (Geissmann y col. 2010).

Tanto en ratón como en humano existen dos tipos fundamentales de DCs que se originan a partir del CDP, las DCs plasmacitoides (pDCs) y las DCs convencionales (cDCs), estas últimas tradicionalmente conocidas como DCs mieloides, aunque, como ya hemos comentado, ambos tipos son de origen mieloide.

Las pDCs fueron descritas inicialmente en humanos como células T plasmacitoides o monocitos plasmacitoides por su morfología similar a la de una célula plasmática, su expresión de CD4 y de marcadores monocíticos como CD123 y CD68. Posteriormente se demostró que podían adquirir características de DCs, tales como su morfología tras maduración. Las pDCs expresan en su superficie las moléculas BDCA2 (también conocido como CD303 o CLEC4C) y BDCA4 (también conocido como CD304 o Neurofilina-1), marcadores que sirven para definir las y diferenciarlas del resto de DCs. Estas células reconocen componentes virales a través de TLRs específicos, como TLR7 y TLR9, produciendo grandes cantidades de IFN $\alpha$  (Ueno y col. 2010).

Puesto que almacenan moléculas MHC-I en el compartimento endosoma-lisosomal, tras ser estimuladas van a activar rápidamente a los linfocitos T  $CD8^+$  desencadenando una respuesta anti-viral específica (Cervantes-Barragan y col. 2012). El  $IFN\alpha$  producido por las pDCs puede también promover la maduración inmunogénica de otros tipos de DCs que a su vez ayudan a activar nuevos clones de células T. Además las pDCs pueden inducir la maduración de linfocitos B activados en células plasmáticas a través tanto de las citocinas que producen como de la señalización por moléculas de superficie (Jego y col. 2003; Shaw y col. 2010). Por otra parte, en estado estacionario las pDCs tienen un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, dirigiendo el desarrollo de los nTreg en el timo (Martin-Gayo y col. 2010) y participando en la tolerancia oral (Liu 2005; Palucka y Banchereau 2012).



**Esquema 1. Origen y diferenciación de las DCs.** En la médula ósea las células madre hematopoyéticas (HSC) dan lugar al progenitor común de macrófagos y DCs (MDP). Este a su vez puede dar lugar a monocitos (Mo) y al precursor común de las DCs (CDP). Los monocitos dejan la médula ósea y entran en la sangre. En condiciones estacionarias los monocitos pueden dar lugar a macrófagos (MΦ) y DCs de la lámina propia que expresan  $CX_3CR1$  ( $CX_3CR1^+$  IpDCs) en tejidos no linfoides. Durante un proceso inflamatorio, los monocitos pueden dar lugar a DCs derivadas de monocitos (moDCs) y a DCs productoras de  $TNF\alpha$  e  $iNOS$  (TipDCs). Bajo condiciones determinadas, los monocitos también diferencian hacia células de Langerhans (LC) y microglia. Por otro lado, el CDP da lugar a precursores de las DCs convencionales (pre-cDC) y a DCs plasmacitoides (pDCs). Las pre-cDCs circulan por la sangre y entran en los órganos linfoides donde dan lugar a cDCs residentes que expresan  $BDCA3$  ( $BDCA3^+$  cDCs) y a las que expresan  $BDCA1$  ( $BDCA1^+$  cDCs). En los órganos no linfoides las pre-cDCs dan lugar a las cDCs migratorias  $BDCA3^+$  cDCs y  $BDCA1^+$  cDCs, y a DCs de la lámina propia que expresan  $CD103$  ( $CD103^+$  IpDCs). Modificado de (Geissmann y col. 2010)

El estudio y la clasificación de las poblaciones de cDCs se inició en ratón donde podemos diferenciar dos grupos de cDCs: las cDCs de tipo CD8 $\alpha$  y las cDCs de tipo CD11b. Dentro de las DCs tipo CD8 $\alpha$  podemos encontrar tanto DC migratorias (CD8 $\alpha^+$  CD103 $^+$  CD11b $^-$  DEC205 $^+$  DNNGR-1 $^-$ ) como residentes en órganos linfoides (CD8 $\alpha^+$  CD103 $^{+/-}$  CD11b $^-$  DEC205 $^+$  DNNGR-1 $^+$ ) (Sancho y col. 2008; Ginhoux y col. 2009; del Rio y col. 2010; Edelson y col. 2010). Las DCs tipo CD11b también incluyen DC residentes y migratorias, ambos compuestos por subgrupos heterogéneos de DCs (Ginhoux y col. 2009; Williams y col. 2010; Henri y col. 2010). Mientras que las cDCs tipo CD11b están más especializadas en la respuesta innata y en la inmunidad mediada por linfocitos T CD4 $^+$ , las cDCs tipo CD8 $\alpha$  son eficientes en la presentación cruzada o “cross-presentation”, es decir, en la presentación de antígenos exógenos en contexto de moléculas MHC-I a linfocitos T CD8 $^+$  (Williams y col. 2010). Además de estos dos grandes grupos, en la lámina propia del intestino existe una población de cDCs migratoria que expresan CD103 y CD11b con características funcionales únicas (Jaensson y col. 2008; Bogunovic y col. 2009; Ginhoux y col. 2009; Schulz y col. 2009; Helft y col. 2010; Mayer y col. 2012). Además se han descrito en ratón otras poblaciones de cDCs con peculiaridades funcionales en diferentes localizaciones anatómicas como el pulmón (Lambrecht y Hammad 2012), la piel (Henri y col. 2010), el intestino (Bogunovic y col. 2012) y el riñón (Teteris y col. 2011).

A diferencia de las pDCs que fueron descubiertas antes en humano que en ratón, el estudio de las cDCs humanas ha sido más complicado por varias razones. Por un lado por la dificultad de hacer estudios funcionales *ex vivo* debido a la baja frecuencia de estas células en sangre. Por otra parte por la falta de sistemas de cultivo que permitan la generación de células equivalentes a ellas *in vitro* y, por último, porque los marcadores para identificar los distintos subtipos difieren sustancialmente de las cDCs de ratón (Croizat y col. 2010).

En humano se han descrito dos tipos de cDCs en sangre inicialmente definidas en función de la expresión de BCDA3 (CD141) y BDCA1 (CD1c). En los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo para caracterizar con más precisión las DCs humanas que equivaldrían a las DCs tipo CD8 $\alpha$  de ratón. Así ya ha quedado establecido que las DCs BDCA3 $^+$  son equivalentes a las DCs tipo CD8 de ratón puesto que ambas comparten características fenotípicas y funcionales tales como su gran capacidad para captar antígenos exógenos y presentarlos en contexto de MHC-I es decir, llevar a cabo presentación cruzada, así como la expresión de XCR1 y DNNGR-1 (Bachem y col. 2010; Croizat y col. 2010; Jongbloed y col. 2010; Poulin y col. 2010; Croizat y col. 2011; Bachem y col. 2012). XCR1 es el receptor de la quimioquina XCL1 que es producida por las

células NK y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados, por lo tanto, su función sería la de promover el contacto entre estos dos tipos celulares (*Bachem y col. 2010; Crozat y col. 2010*). Por su parte DNGR-1, también conocido como CLEC9A, es un receptor tipo lectina que detecta células necróticas, esencial para que estas DCs puedan llevar a cabo la presentación cruzada de péptidos procedentes de células necróticas infectadas por virus (*Poulin y col. 2010; Iborra y col. 2012; Schreibelt y col. 2012; Zelenay y col. 2012*). Además tanto las DCs BDCA3<sup>+</sup> humanas como las DCs tipo CD8<sup>+</sup> de ratón expresan los factores de transcripción Batf3 e IRF-8, mientras que han perdido la expresión de IRF-4, factor requerido para el desarrollo de otros tipos de DCs (*Jongbloed y col. 2010; Poulin y col. 2010; Villadangos y Shortman 2010*).

Por otra parte, las DCs BDCA1<sup>+</sup> serían funcionalmente equivalentes a las DCs tipo CD11b de ratón y estarían especializadas en el reconocimiento de patógenos extracelulares y en la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (*Crozat y col. 2010*). El número de trabajos enfocados al estudio de esta población es reducido. No obstante, se ha descrito que a diferencia de las DCs BDCA3<sup>+</sup>, las DCs BDCA1<sup>+</sup> expresan TLR4 y responden a *Escherichia coli* secretando IL-10 e inhibiendo la proliferación de linfocitos T alogénicos (*Kassianos y col. 2012*).

Además de en la sangre, en los últimos años se ha descrito la presencia de estas poblaciones de DCs en órganos no linfoides. Recientemente se ha demostrado la presencia de DCs BDCA3<sup>+</sup> en el hígado, pulmón y dermis humana (*Haniffa y col. 2012*). Las DCs BDCA3<sup>+</sup> de la dermis producen IL-10 constitutivamente e inducen tanto la anergia de células T autoreactivas mediante presentación cruzada de auto-antígenos, como la activación de linfocitos Treg, jugando por tanto un papel esencial en la homeostasis de la piel (*Chu y col. 2012*). Respecto a las DCs BDCA1<sup>+</sup> se ha descrito una población en la dermis humana con gran capacidad para estimular linfocitos T (*Zaba y col. 2007*).

## **1.2 DCs derivadas de monocitos**

Como hemos comentado anteriormente, algunos tipos de DCs pueden originarse a partir de monocitos. Los monocitos derivan de un progenitor de la médula ósea y se encuentran circulando por la sangre. Pueden subdividirse en varias poblaciones que difieren en su tamaño, en la expresión de receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión, así como en su capacidad para diferenciar hacia macrófagos o DCs en respuesta a una estimulación por citocinas o moléculas microbianas (*Auffray y col. 2009*). Los monocitos median en la defensa contra

patógenos microbianos (*Serbina y col. 2008*) y también están implicados en diversas enfermedades inflamatorias, incluyendo la aterosclerosis (*Woollard y Geissmann 2010*).

Los monocitos pueden dar lugar a diferentes tipos de DCs tanto en condiciones de reposo como tras infección, inflamación o pérdida de DCs (*Dominguez y Ardavin 2010; Geissmann y col. 2010*). En condiciones estacionarias se ha demostrado que las DCs de pulmón y un subtipo de las DCs presentes en la lámina propia del intestino de ratón derivan de monocitos (*Varol y col. 2007*). Asimismo, los monocitos también pueden dar lugar a LCs. Recientemente se ha demostrado que las LCs presentes en estado adulto proceden, en su mayoría, de monocitos de hígado fetal embrionario (*Hoeffel y col. 2012*). En condiciones de reposo las LCs son independientes de precursores circulantes y se mantienen o bien gracias a su capacidad de autorrenovación y/o a través de un precursor localizado en la epidermis (*Merad y col. 2002*). Sin embargo, en situaciones de infección, inflamación o pérdida de DCs, los monocitos pueden actuar como precursores de las LCs y las DCs de la dermis (*Valladeau y Saeland 2005; Ginhoux y col. 2006*). En humano las LCs son eficientes en la presentación cruzada de antígenos a linfocitos T CD8<sup>+</sup> induciendo así su diferenciación hacia linfocitos T citotóxicos efectores (*Stoitzner y col. 2006; Segura y col. 2012*).

En situaciones de inflamación, los monocitos van a dar lugar a DCs derivadas de monocitos (moDCs). Las moDCs son el tipo de DCs humanas más estudiadas porque se pueden generar *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica. *In vivo* las moDCs sólo aparecen cuando son requeridas en los sitios de inflamación (*Tacke y Randolph 2006*). Así se ha demostrado un papel crucial de las moDCs en la inmunidad contra ciertos patógenos tales como en la infección por *Leishmania major* (*Leon y col. 2007*), virus influenza (*Nakano y col. 2009*), virus herpes simplex (*Eidsmo y col. 2009*), *Aspergillus fumigatus* (*Hohl y col. 2009*) y en pacientes con lepra (*Krutzik y col. 2005*). En ratón las moDCs expresan CD11b y CD24 (*Xu y col. 2007*), así como DC-SIGN/CD209 y MMR/CD206 (*Cheong y col. 2010*). Funcionalmente las moDCs tienen gran capacidad para producir citocinas pro-inflamatorias (*Xu y col. 2007; Zhan y col. 2010*) e inducen la diferenciación hacia Th1 (*Leon y col. 2007*). Por otra parte, también tienen capacidad para activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> memoria en tejidos no linfoides (*Wakim y col. 2008*) y son eficientes en la presentación cruzada de antígenos tanto *in vitro* como *in vivo* (*Cheong y col. 2010*).

Los monocitos también pueden dar lugar a otro tipo de DCs llamadas TipDCs, puesto que son células productoras de TNF $\alpha$  y iNOS (Oxido Nítrico Sintetasa inducible) (*Serbina y col.*

2003). Sin embargo estas células parece que no están involucradas en la inducción de una respuesta T antígeno-específica. Existen diversos trabajos que describen la existencia de células fenotípicamente similares a las TipDCs involucradas en los mecanismos de la defensa innata contra patógenos bacterianos y parásitos (*De Trez y col. 2009; Guilliams y col. 2009*). No obstante, existe cierta controversia en considerar si estas células representan una subpoblación de DCs especializadas en la inmunidad innata frente a patógenos o si en realidad son macrófagos activados de manera clásica, puesto que presentan muchas características comunes con estos últimos (*Dominguez y Ardavin 2010*).

La mayor parte de los estudios *in vitro* con DCs humanas se basan en la exposición de monocitos a diferentes combinaciones de citocinas basadas en el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF). La combinación de GM-CSF con IL-4 fue descrita por primera vez por Sallusto y Lanzavecchia en 1994, y es la combinación de citocinas más extensamente caracterizada y utilizada para la diferenciación de DCs *in vitro* a partir de monocitos (*Sallusto y Lanzavecchia 1994*). GM-CSF es necesario para la supervivencia y diferenciación de los monocitos, mientras que IL-4 induce su diferenciación hacia DCs, inhibiendo la diferenciación hacia macrófagos (*Conti y Gessani 2008*). Además de su combinación con IL-4, GM-CSF puede combinarse con otras citocinas como IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  o IL-15 para inducir la diferenciación de distintos tipos de DCs. La combinación de citocinas es crucial porque determina el fenotipo y la función de las DCs resultantes. Así cultivando monocitos en presencia de GM-CSF, IL-4 y TGF $\beta$ 1 se pueden obtener LCs (*Conti y Gessani 2008; Palucka y Banchereau 2012*).

Los monocitos humanos cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4 dan lugar a DCs con un fenotipo inmaduro y con reducida capacidad para la presentación de antígenos. Tras la adición de diferentes factores que inducen su maduración, las DCs adquieren características de DCs maduras o activadas incluyendo cambios en su morfología, pérdida de la capacidad para captar antígenos, aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras así como MHC tipo I y II, y adquieren la capacidad para inducir eficientemente la activación de linfocitos T *naïve* (*Conti y Gessani 2008*).

Las DCs, por tanto, juegan un papel clave tanto en el inicio de las repuestas inmunes como en la consecución de la tolerancia dependiendo de su estado de maduración y activación.

Son, por todo ello, importantes herramientas terapéuticas potenciales tanto para dirigir y promover respuestas específicas (vacunas contra el cáncer) como para atenuar o prevenir el rechazo de transplantes, la enfermedad injerto contra huésped (EICH) o los desórdenes autoinmunes. En este sentido, se están dirigiendo numerosos esfuerzos con el fin de esclarecer qué mecanismos son los que regulan la diferenciación y maduración de estas células y cuales dirigen la aparición *in vivo* de las distintas poblaciones de DCs en localizaciones y momentos específicos.

## **2. PROTEÍNAS WNT**

La familia de proteínas de secreción Wnt está formada por 19 glicoproteínas que se caracterizan por tener residuos de cisteína muy conservados. Además están modificadas lipídicamente, siendo estos residuos lipídicos muy importantes para su secreción y para una eficiente señalización (*Clevers y Nusse 2012*).

La señalización Wnt comienza con la unión de una proteína Wnt a un receptor de la familia Frizzled (Fzd), a través de su dominio rico en cisteína (CRD). En humanos se conocen 10 miembros de la familia de proteínas Fzd. Estas proteínas están formadas por 7 dominios transmembrana y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Se sabe que existe cierta especificidad entre determinados receptores Fzd y las proteínas Wnt (*Hsieh 2004; Gordon y Nusse 2006*). Además de la interacción entre el ligando Wnt y su receptor Fzd, se necesita la mediación de un co-receptor para iniciar la señalización Wnt. Dos miembros de la familia LRP (Low-density-lipoprotein Receptor-related Protein), LRP5 y LRP6, actúan como co-receptores de las proteínas Wnt, y forman un complejo terciario, junto con el receptor Fzd, que iniciará la ruta de señalización Wnt canónica (*Tamai y col. 2000*). Existen otras proteínas que pueden actuar como receptores o co-receptores de Wnt, como son Ror1, Ror2 y Ryk, todos pertenecientes a la superfamilia de receptores tirosina quinasa (RTK) (*Hendrickx y Leyns 2008; Clevers y Nusse 2012*).

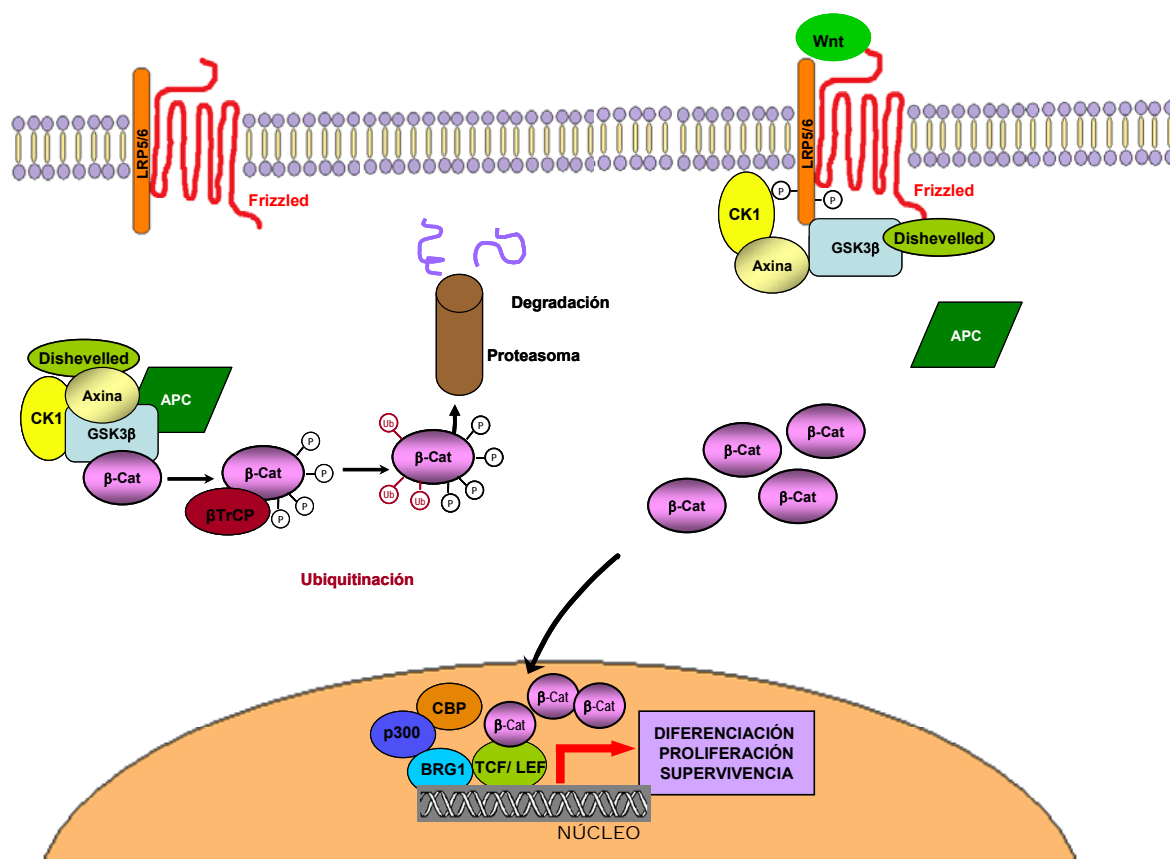
La unión del ligando Wnt a su complejo receptor conduce a la activación de múltiples cascadas de señalización intracelulares mediadas por la proteína Disheveled (Dsv). Existen al menos tres rutas de señalización Wnt que surgen a partir de Dsv, la más conocida y estudiada es la ruta canónica o ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, la segunda que implica un incremento del  $Ca^{+2}$  es

conocida como ruta Wnt/Ca<sup>+2</sup> y la tercera, que regula la organización del citoesqueleto, se conoce como ruta PCP (Planar-Cell-Polarity) o ruta *Wnt/polarity* (Komiya y Habas 2008; Gao y Chen 2010).

## **2.1 Ruta Wnt canónica**

La proteína  $\beta$ -catenina es el mediador principal de la ruta canónica de Wnt. Originalmente se identificó como una proteína periférica de membrana que cumplía un papel crucial en las uniones adherentes, sin embargo sus funciones son más amplias; existe otro reservorio de  $\beta$ -catenina citoplásmica libre que tiene una vida media muy corta por acción de un complejo multiproteico de destrucción que marca a la proteína para su posterior degradación por el proteosoma (Valenta y col. 2012). Este complejo está formado por la proteína Axina (Axis Inhibitor), la proteína APC (Adenomatous Polyposis Coli), la caseína quinasa 1 (CK1), y la glucógeno sintetasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Angers y Moon 2009). En ausencia de señal Wnt, la proteína Axina está unida a APC y a la  $\beta$ -catenina recién sintetizada, favoreciendo su fosforilación en residuos Ser/Thr de la zona amino terminal por parte las quinasas, CK1 y GSK3 $\beta$ , que forman parte del complejo. Como resultado de la fosforilación se crea un motivo reconocido por la proteína  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -transducin repeat containing protein) que forma parte del complejo Ubiquitin ligasa E3 que marca a la  $\beta$ -catenina con moléculas de ubiquitina para su degradación proteosomal (Esquema 2).

En presencia de ligando Wnt, éste se une a un receptor Fzd y al co-receptor LRP5 o LRP6; a través de Dsv se promueve la fosforilación de LRP5 o LRP6 por CK1 y GSK3 $\beta$  permitiendo el reclutamiento de la proteína Axina a los residuos fosforilados de LPR; de esta manera la proteína Axina se separa del complejo de destrucción inhibiendo la fosforilación de  $\beta$ -catenina y su posterior degradación. La acumulación de  $\beta$ -catenina no fosforilada en el citoplasma permite su translocación al núcleo donde reemplaza al factor co-represor de la familia GRC (Groucho-related genes) que está unido a un factor de transcripción miembro de la familia TCF (T Cell Factor). A través de su región C-terminal, dominio de transactivación,  $\beta$ -catenina se une a los factores de transcripción TCF y LEF (Lymphocyte Enhancer-binding Factor). A continuación,  $\beta$ -catenina recluta a la proteína CBP (Cyclic AMP-responsive-element-binding (CREB)- Binding Protein) y otras proteínas como p300 (acetilasa de histonas) y BRG1 (Brama related gene1) -componente del complejo remodelador de la cromatina en mamíferos-, facilitando la transcripción de los genes diana (Reya y Clevers 2005; Staal y col. 2008; Clevers y Nusse 2012).



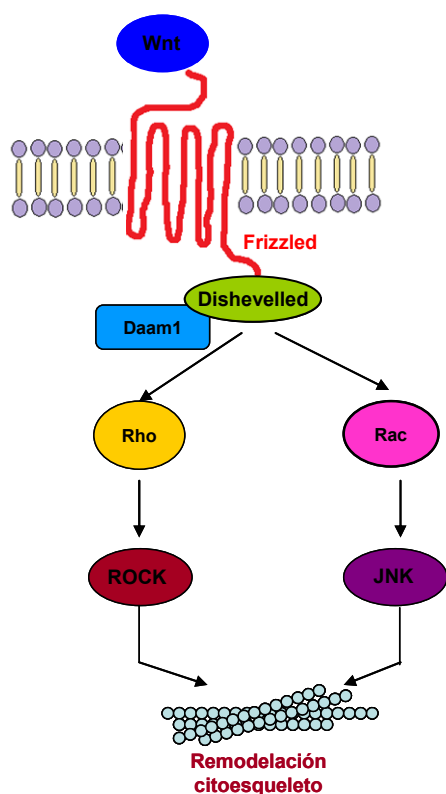
**Esquema 2. Ruta de señalización Wnt canónica.** En ausencia de ligando Wnt (izquierda) las quinasas CK1 y GSK3 $\beta$  que forman parte del complejo multiprotéico de destrucción junto con las proteínas Axina, APC, fosforilan a  $\beta$ -catenina. A continuación, la  $\beta$ -catenina fosforilada es marcada con residuos de ubiquitina por  $\beta$ TrCP para su posterior degradación por el proteasoma. Cuando el ligando Wnt se une a su complejo receptor (derecha), formado por Fzd y LRP5/6, se produce la unión de Dsv a la cola citoplásmica de Fzd lo que promueve la fosforilación de LRP5/6 por CK1 y GSK3 $\beta$ . Esto induce el reclutamiento de Axina a la membrana inhibiéndose así la fosforilación y posterior degradación de  $\beta$ -catenina. Esto se traduce en una acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma que, a continuación, se transloca al núcleo donde se va a unir a los factores de transcripción TCF/LEF estimulando la expresión de los genes diana (Modificado de (Staal y Clevers 2005; Staal y col. 2008)).

En el núcleo la actividad transcripcional del complejo  $\beta$ -catenina-TCF puede ser modulada por distintas proteínas que compiten con los miembros de la familia TCF/LEF por unirse a  $\beta$ -catenina. Se ha visto que Chibby inhibe la activación transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina por competencia con LEF1 en la unión a  $\beta$ -catenina. Otro factor similar, ICAT (cell autonomus inhibitor of  $\beta$ -catenin and TCF) interfiere en la interacción entre  $\beta$ -catenina y los miembros de la familia TCF/LEF. Existen además otras dos proteínas nucleares adicionales que modulan la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina: pygopus (PYGO) y legless (LGS). Por otra parte, se conocen al menos ocho isoformas de TCF, que se forman por *splicing* alternativo, con distinta capacidad para unirse a  $\beta$ -catenina. En general las isoformas largas de TCF mantienen el

dominio amino terminal de unión a  $\beta$ -catenina, mientras que las isoformas cortas no pueden unirse a  $\beta$ -catenina y funcionan como un represor natural de la ruta (Staal y Clevers 2005; Staal y col. 2008).

## 2.2 Rutas Wnt no canónicas

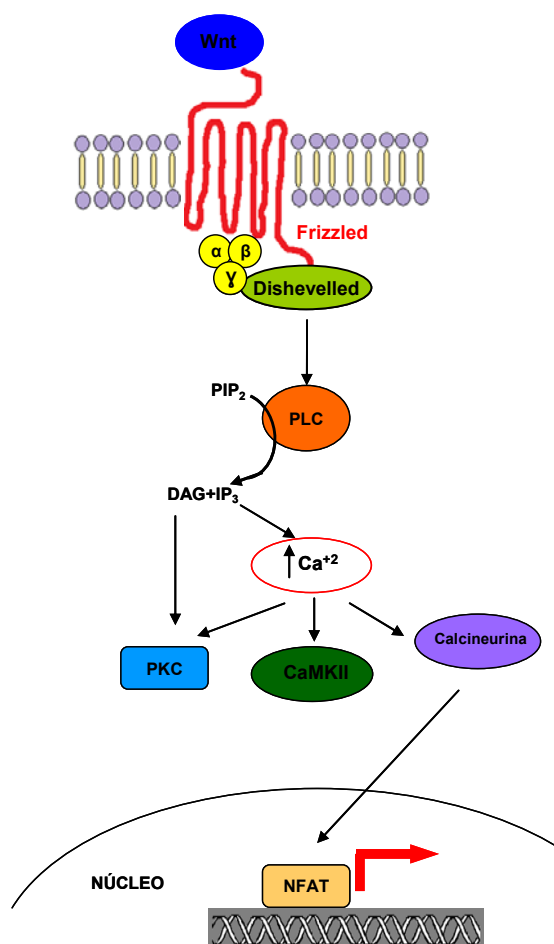
Como hemos comentado anteriormente, además de la ruta Wnt canónica existen al menos otras dos rutas de señalización mediadas por receptores Fzd, pero que son independientes de LRP5/6 y  $\beta$ -catenina (Hendrickx y Leyns 2008). En la ruta PCP la señal Wnt es transducida por Dsv que activa, a través de dos rutas paralelas a las pequeñas GTPasas Rho (Ras homologue gene-family), y Rac (Ras-related C3 botulinum toxin substrate). Para la activación de Rho la señalización Wnt induce la asociación de Dsv con Daam1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis) promoviendo la activación de esta última. La activación de Rho por el complejo Dsv-Daam1 permite la activación de la quinasa ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing kinasa) que media la reorganización del citoesqueleto de actina. Por otra parte, Dsv activa a la GTPasa Rac de forma independiente de Daam1, y ésta a su vez activa la ruta de JNK (JUN N-terminal quinasa) influyendo en el citoesqueleto y la forma celular (Esquema 3) (Komiya y Habas 2008; Staal y col. 2008).



**Esquema 3. Ruta PCP.** En esta ruta la señalización Wnt es mediada por el receptor Fzd promoviendo la activación de Dsv, pero de forma independiente de LRP5/6. A continuación Dsv induce la activación de Rho a través de Daam1, que a su vez activa ROCK. Por otra parte, Dsv también activa a Rac que a su vez activa a JNK. La señalización procedente de ROCK y JNK produce cambios en el citoesqueleto de actina, la polarización y forma celular (Adaptado de (Komiya y Habas 2008; Staal y col. 2008).

La otra ruta Wnt no canónica más estudiada es la ruta Wnt/  $Ca^{+2}$ . Esta ruta puede modular la señalización canónica y la señalización PCP. En este caso la señal Wnt mediada por Fzd activa a Dsv a través de la activación de proteínas G triméricas. Dsv a través de PLC (Fosfolipasa C) promueve la fragmentación de fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), que activa a la PKC (Protein quinasa C). El IP<sub>3</sub> produce un incremento del  $Ca^{+2}$  intracelular lo que activa a diferentes proteínas como la PKC, la CamKII (Ca<sup>+2</sup>-calmodulina quinasa II) y la Calcineurina que activa a NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) (Esquema 4) (Komiya y Habas 2008; Staal y col. 2008).

**Esquema 4. Ruta Wnt/ $Ca^{+2}$ .** En esta ruta el ligando Wnt se une a Fzd mediante la activación de Dsv a través de proteínas G triméricas. Dsv activa PLC induciendo la fragmentación de PIP<sub>2</sub> en DAG e IP<sub>3</sub>, lo que conlleva un incremento en los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular lo que activa a la CaMKII y la Calcineurina que a su vez activa al factor NFAT. Por su parte, el DAG, junto con el  $Ca^{+2}$ , activa a PKC (Modificado de (Komiya y Habas 2008; Staal y col. 2008).



Históricamente, las proteínas Wnt han sido agrupadas en dos categorías, canónica y no-canónica, en base a su actividad. Los ligandos Wnt canónicos (p.ej. Wnt1, Wnt3a y Wnt8) estabilizan  $\beta$ -catenina, que a su vez promueve la transcripción de los genes diana de los factores TCF/LEF. Por su parte los ligandos Wnt no canónicos (p.ej. Wnt4, Wnt5a y Wnt11) activan la ruta PCP, la ruta Wnt/ $Ca^{+2}$  u otra ruta independiente de  $\beta$ -catenina. Sin embargo, algunos Wnt y receptores Fzd pueden activar tanto la ruta canónica como las rutas no canónicas, lo que descarta la clasificación directa de las proteínas Wnt como canónicas o no canónicas. Incluso un mismo

ligando Wnt puede activar dos rutas diferentes uniéndose a un mismo receptor a través de diferentes mecanismos (*Sato y col. 2010*). Todo esto sugiere que la clasificación funcional de los ligandos Wnt depende del repertorio de receptores que tenga un tipo celular concreto en un momento de desarrollo determinado (*Kawano y Kypta 2003; Komiya y Habas 2008; van Amerongen 2012*).

### **2.3 Regulación de la señalización Wnt**

La señalización Wnt está regulada a distintos niveles por una amplia gama de moléculas efectoras. Estas moléculas funcionan como agonistas o antagonistas y actúan o bien de forma intracelular modulando los componentes de la maquinaria de transducción de señal o de forma extracelular modulando la interacción ligando–receptor.

Hasta la fecha se conocen seis familias de antagonistas Wnt que son proteínas de secreción, y cuatro familias de proteínas transmembrana. Dentro de los inhibidores secretados encontramos: las proteínas Dickkopf (Dkk), las proteínas de secreción relacionadas con Frizzled (sFRP), el factor inhibidor de Wnt 1 (WIF-1), las proteínas Wise/SOST, Cerberus y la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina 4 (IGFBP-4) (*Cruciat y Niehrs 2012*).

Dkk y Wise/SOST inhiben específicamente la señalización Wnt canónica porque se unen a LRP5/6 con alta afinidad, impidiendo la formación del complejo receptor. Sin embargo, las sFRP, Wif-1 y Cerberus se unen directamente a Wnt impidiendo su unión al complejo receptor inhibiendo tanto la ruta canónica como la no canónica. Además los antagonistas sFRPs pueden unirse a Fzd inhibiendo la señalización Wnt. Por otro lado, IGFBP-4 se une a LRP5/6 y Fzd impidiendo la unión del ligando Wnt e inhibiendo, por tanto, la señalización Wnt canónica (*Kawano y Kypta 2003; Kikuchi y col. 2009; Cruciat y Niehrs 2012*).

También existen varias familias de proteínas transmembrana que pueden antagonizar la señal Wnt. Entre ellas encontramos la familia de proteínas Shisa, el factor inhibidor activado por Wnt 1 (Waif1), APCDD1 y Tiki-1, este último descrito recientemente como una metaloproteasa que inhibe la señalización Wnt eliminando ocho residuos de la zona amino terminal del propio ligando impidiendo su unión al receptor (*Zhang y col. 2012*).

Además de antagonistas existen también proteínas agonistas o activadoras de la señal Wnt. La familia de proteínas R-spondins está formada por 4 factores de crecimiento que, junto con el ligando, potencian la activación de la señalización Wnt canónica (*Cruciat y Niehrs 2012*).

El mecanismo por el cual actúan estas proteínas no se conoce completamente, aunque recientemente se ha descrito la existencia de LGR4 y LGR5, dos receptores necesarios para la señalización de R-spondin, cuya activación potencia la ruta Wnt canónica mediada por Wnt3a (*Glinka y col. 2011*). Además las R-spondin también pueden activar la ruta Wnt/PCP. Por otro lado, la proteína Norrin se une con gran afinidad a Fzd4, formando un complejo con LPR5 y activando, en última instancia, la transcripción de genes diana de los factores TCF/LEF (*Xu y col. 2004; Cruciat y Niehrs 2012*). Se ha descrito también la existencia de otro co-factor extracelular llamado Cthrc1 que estabiliza el complejo Wnt-Fzd-Ror2 y activa selectivamente la ruta PCP (*Yamamoto y col. 2008*).

Además de proteínas con capacidad para antagonizar la señal Wnt, existen pequeñas moléculas que pueden funcionar como agonistas o antagonistas de esta señalización. Las pequeñas moléculas agonistas de la señalización Wnt más usadas inhiben a GSK3. Entre ellas la más clásica es el Litio, que a concentraciones mM es un potente inhibidor de GSK3 permitiendo la estabilización de  $\beta$ -catenina (*Willert y Nusse 2012*). Pero el uso de inhibidores de GSK3 puede ser problemático puesto que esta enzima es una pieza clave en otras muchas rutas de señalización además de la señalización Wnt. Recientemente, han salido al mercado IWP (Inhibitor of Wnt Production) y IWR (Inhibitor of Wnt Response) dos potentes inhibidores con alta especificidad por la señalización Wnt (*Chen y col. 2009*). IWR interacciona y estabiliza la proteína Axina acelerando la degradación de  $\beta$ -catenina, mientras que IWP interacciona con Porc inhibiendo su actividad acetil transferasa. Puesto que la actividad de Porc es esencial para el procesamiento de las proteínas Wnt, IWP bloquea, en última instancia, la secreción de todos los ligandos Wnt (*Willert y Nusse 2012*).

Pero la ruta de señalización Wnt es más compleja aún, si cabe. No sólo se han descrito ligandos no pertenecientes a la familia de proteínas Wnt que señalizan a través de los receptores Fzd, como las proteínas Norrin y R-spondin sino que existen también receptores alternativos a los Fzd, como Ryk, Ror1 y Ror2, que median la señalización Wnt (*Hendrickx y Leyns 2008; Willert y Nusse 2012*).

El descubrimiento de dominios de unión a Wnt en Ror1, Ror2 y Ryk, proteínas pertenecientes la superfamilia de RTK, hizo pensar que la señal Wnt podría ser transducida por estos receptores distintos a los Fzd. Desde entonces se ha demostrado que estos receptores están implicados tanto en la señalización Wnt canónica como en la no canónica (*Angers y Moon 2009; van Amerongen 2012*). Ror1 y Ror2 pueden unirse a diferentes ligandos Wnt. Por un lado, Ror2

transmite la señal Wnt5a provocando la inhibición de la señalización Wnt canónica (*Mikels y Nusse 2006*). Sin embargo, también se ha demostrado que Ror2 promueve la señalización Wnt canónica actuando como co-receptor junto con Fzd (*Li y col. 2008*). En el caso de Ryk, se ha demostrado que interacciona con Fzd y Dvl y es esencial para la señalización Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina. Pero al igual que Fzd y Ror, Ryk puede tener diferentes funciones dependiendo del contexto celular (*Angers y Moon 2009; van Amerongen 2012*).

### **3. FUNCIONES DE LA SEÑALIZACIÓN WNT**

Las proteínas Wnt participan en diversos fenómenos biológicos durante el desarrollo tales como la determinación de los diferentes destinos celulares, la proliferación de células progenitoras, el establecimiento del eje dorsal y el control de la división celular asimétrica (*van Amerongen y Nusse 2009*). En el estado adulto las proteínas Wnt controlan el mantenimiento y la diferenciación de las células madre (Nusse 2008), promueven la regeneración del hueso (*Minear y col. 2010*), modulan el metabolismo del tejido adiposo (*Ouchi y col. 2010; Bilkovski y col. 2011*) y regulan la hematopoyesis (*Staal y Luis 2010*). Además, una desregulación de la señalización Wnt se asocia al desarrollo de cáncer y otras enfermedades (*Wend y col. 2010; Clevers y Nusse 2012; Polakis 2012*). Por otra parte, se ha propuesto a las proteínas Wnt como un factor endocrino asociado al envejecimiento (*Brack y col. 2007; Liu y col. 2007*) la septicemia (*Pereira y col. 2008*) y la obesidad (*Schulte y col. 2012*).

#### **3.1 Wnt y hematopoyésis**

La idea de que la señalización Wnt pudiera estar involucrada en la homeostasis del sistema hematopoyético surgió a partir de estudios de progenitores y células madre en otros sistemas (*Reya y Clevers 2005*). Sin embargo, las primeras evidencias que muestran la implicación directa de la señalización Wnt en la biología de las HSC (Hematopoietic Stem Cell) parten del hecho de que los ligandos Wnt y sus receptores son expresados no sólo por estas células sino también por las que constituyen su microambiente, sugiriendo que Wnt puede tener un papel tanto autocrino como paracrino sobre la población hematopoyética (*Rattis y col. 2004; Nemeth y Bodine 2007; Fleming y col. 2008; Staal y col. 2008*). En este sentido, diferentes aproximaciones, utilizando medios condicionados con proteínas Wnt, o proteínas Wnt solubles, resultan en un aumento de la expansión/ supervivencia de los progenitores hematopoyéticos más

primitivos, frenando al mismo tiempo su diferenciación, e incrementando además su eficacia de reconstitución del sistema hematopoyético de ratones letalmente irradiados (*Austin y col. 1997; Van Den Berg y col. 1998; Murdoch y col. 2003; Willert y col. 2003; Staal y col. 2008; Malhotra y Kincade 2009; Staal y Luis 2010*).

Por otra parte, gran cantidad de evidencias demuestran que la señalización Wnt es esencial para la proliferación de los timocitos y el desarrollo de los linfocitos T (*Malhotra y Kincade 2009*). En el timo, la regulación de la supervivencia y proliferación de los timocitos está estrechamente integrada en el propio proceso de diferenciación T. La señalización Wnt parece formar parte del conjunto de señales implicadas en la modulación de los tres procesos, participando de forma distinta durante las diferentes etapas de la diferenciación T. De hecho los factores de transcripción TCF-1 y LEF-1 fueron los primeros componentes de la señalización Wnt cuya expresión fue demostrada en el timo, antes de que se supiera que formaban parte de ella (*Oosterwegel y col. 1991; Verbeek y col. 1995; Hattori y col. 1996*). Desde entonces muchos han sido los trabajos que, utilizando diferentes estrategias experimentales, han demostrado el papel de la señalización Wnt en la regulación de la diferenciación T (*Staal y col. 2008; Staal y Sen 2008*). Colectivamente, todos estos estudios demuestran un papel crucial de la señalización Wnt en los estadios más inmaduros de la diferenciación T, donde proporciona señales esenciales de proliferación (*Staal y Luis 2010*). Asimismo varios trabajos han revelado un papel similar, aunque quizás menos importante que en el desarrollo de los linfocitos T en el timo, de la señalización Wnt en el desarrollo de los progenitores de células B en la médula ósea (*Reya y col. 2000; Liang y col. 2003; Ranheim y col. 2005; Dosen y col. 2006; Staal y col. 2008; Staal y Sen 2008*).

### **3.2 Señalización Wnt y regulación de la respuesta inmune**

Diversos tipos celulares implicados en la respuesta del sistema inmune secretan proteínas Wnt. Así los ligandos Wnt procedentes de células endoteliales (*Cheng y col. 2003; Wu y col. 2007*), células estromáticas de médula ósea (*Rauner y col. 2012*), DCs (*Blumenthal y col. 2006; Lehtonen y col. 2007; Manicassamy y col. 2010*), macrófagos (*Blumenthal y col. 2006; Pereira y col. 2008; Bilkovski y col. 2011*) y células T (*Ghosh y col. 2009*) podrían regular la respuesta inmune frente a un proceso infeccioso, de inflamación o cáncer.

Diferentes componentes de la señalización Wnt canónica forman parte a su vez de sistemas moleculares que modulan la función inmune y, de forma global, se sugiere que la activación de esta ruta podría tener un papel anti-inflamatorio. De hecho, la inhibición de GSK3, proceso que ocurre durante la activación de la ruta Wnt canónica, tiene un efecto global anti-inflamatorio y afecta negativamente a la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (*Beurel y col. 2010; Beurel y col. 2011*). Por otra parte, se ha demostrado que una amplia variedad de inhibidores de esta enzima, incluyendo el litio, actúan como moléculas anti-inflamatorias en diferentes tipos celulares de distintos órganos y sistemas (*Klamer y col. 2010*). El papel pro-inflamatorio de GSK3 está mediado en gran parte por la activación de NF- $\kappa$ B (*Wang y col. 2010*). Reforzando el poder anti-inflamatorio de la ruta Wnt canónica,  $\beta$ -catenina es capaz de interactuar directamente con NK- $\kappa$ Bp65 lo que se traduce en el bloqueo de esta señalización (*Deng y col. 2002; Du y col. 2009; Dai y col. 2011; Die y col. 2012*). Además, la activación de la ruta Wnt canónica en sí misma afecta a la migración de distintos tipos celulares implicados en los procesos de inflamación. Así, Wnt3a activa esta ruta en monocitos produciendo una reducción de su migración transendotelial, regulando así los procesos inflamatorios (*Tickenbrock y col. 2006*). En contraste, proteínas Wnt producidas por células endoteliales activan la ruta dependiente de  $\beta$ -catenina en linfocitos T efectoras induciendo su transmigración hacia la zona de inflamación (*Wu y col. 2007*). Curiosamente, durante el proceso de inflamación los macrófagos cambian su perfil de receptores para proteínas Wnt, modificando su respuesta a dicha señal de no canónica (pro-inflamatoria) a canónica (anti-inflamatoria) (*Neumann y col. 2010*).

En relación al papel que juega la ruta Wnt canónica en las poblaciones de células T periféricas existe cierta controversia y todavía queda mucho por esclarecer, aunque en los últimos años se ha conocido más acerca del papel de esta señalización.

Respecto a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, en estado *naive* expresan altos niveles de los factores de transcripción TCF-1 y LEF-1, pero mientras que su expresión se reduce en las células efectoras vuelve a incrementarse cuando éstas pasan a ser células T CD8<sup>+</sup> de memoria, sugiriendo que la activación de la señal Wnt canónica favorece la diferenciación de esta población (*Zhao y col. 2010*). Usando Wnt3a o inhibidores de GSK3 $\beta$  en células T CD8<sup>+</sup> de ratón, Restifo y colaboradores (2009) han demostrado que activar la ruta Wnt canónica produce un arresto en la diferenciación de estas células pero promueve la generación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> memoria con características de células progenitoras (*Gattinoni y col. 2009*). Sin embargo este trabajo ha sido cuestionado por otros autores, puesto que obtienen resultados distintos

cuando activan la ruta Wnt canónica mediante estabilización de  $\beta$ -catenina que cuando usan células que sobreexpresan Wnt3a (Xue y Zhao 2012). No obstante, sí existe consenso en cuanto a la idea de que la activación constitutiva de la señalización Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina reduce la expansión de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores.

Numerosos estudios tratan de explicar los mecanismos que regulan la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los distintos tipos de células efectoras con el propósito de facilitar el desarrollo de nuevos tratamientos para las enfermedades provocadas por la desregulación del sistema inmune. Dentro de estos mecanismos se encuentra la señalización Wnt- $\beta$ -catenina-TCF1. En este sentido, dos trabajos recientes han demostrado que la señalización Wnt canónica es necesaria para iniciar la diferenciación Th2 (Yu y col. 2009; Notani y col. 2010). TCF1 induce la expresión de GATA-3, factor de transcripción necesario para la producción de IL-4 y por tanto, para la diferenciación Th2 (Yu y col. 2009). En línea con estos resultados, la adición de Dkk1, inhibidor de la señalización Wnt canónica, o el silenciamiento de  $\beta$ -catenina en cultivos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, reduce la expresión de GATA-3 y la producción de citocinas Th2 (Notani y col. 2010).

En cuanto a la diferenciación Th1, es lógico pensar que si la señalización Wnt canónica promueve la diferenciación Th2, va a inhibir la generación de linfocitos Th1. Esto es bastante probable puesto que TCF1 regula negativamente la producción de IFN $\gamma$ , lo que parece apoyar esta idea (Yu y col. 2009). Sin embargo, mientras que la diferenciación Th2 requiere tanto de  $\beta$ -catenina como de TCF1, el efecto negativo de TCF1 sobre la diferenciación Th1 es independiente de  $\beta$ -catenina (Yu y col. 2009). Asimismo, se ha visto que T-bet, factor de transcripción fundamental en la diferenciación Th1, regula negativamente TCF1 lo que conlleva la inhibición de la diferenciación Th2 y la estimulación de la polarización Th1 (Oestreich y col. ; Oestreich y col. 2011).

Sobre el papel que juega la señalización Wnt en la diferenciación Th17 existe cierta controversia. Datos de dos trabajos recientes muestran que TCF1 regula la diferenciación Th17 (Ma y col. 2011; Yu y col. 2011). Linfocitos T TCF1<sup>-/-</sup> muestran una mayor diferenciación hacia Th17, un incremento en la producción de citocinas Th17, incluyendo IL-17A e IL-17F y un aumento en la expresión del receptor de IL-23 (Ma y col. 2011). Sin embargo, a diferencia de otros factores que regulan la diferenciación Th17, TCF1 no modifica los niveles de expresión de ROR $\gamma$ t, factor de transcripción específico del linaje Th17, lo que sugiere de TCF1 regula IL-17 en las células T maduras (Ma y col. 2011; Yu y col. 2011). Sin embargo, la expresión de TCF1 se reduce rápidamente tras la activación de las células T, por lo que se propone que TCF1 podría

regular modificaciones epigenéticas en el locus IL-17 durante el desarrollo de las células T en el timo (*Ma y col. 2012*). No obstante, un trabajo reciente demuestra que la adición de sFrp1, inhibidor de la señalización Wnt canónica, durante la estimulación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, induce un incremento en la producción de IL-17 (*Lee y col. 2012*). Es más, observan como la activación de la señalización Wnt, mediante la adición de Wnt3a o Wnt5a, reduce los niveles de IL-17 sugiriendo un papel negativo de la señalización Wnt en la diferenciación Th17. Los autores proponen que la sobreexpresión de sFrp1 favorecería entonces el desarrollo de patologías mediadas por Th17, como la artritis reumatoide, lo que contrasta con trabajos anteriores que denotan que Wnt5a está implicado en la etiología de esta enfermedad (*Sen y col. 2001*).

Finalmente, aunque son pocos los trabajos que han estudiado el papel de la señalización Wnt- $\beta$ -cateína-TCF1 en el desarrollo, diferenciación y función de los linfocitos Treg, un estudio de Ding y colaboradores (2008) muestra que  $\beta$ -catenina promueve la supervivencia y función de las células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y protege de la enfermedad intestinal inflamatoria (*Ding y col. 2008; Ma y col. 2012; Xue y Zhao 2012*).

Continuando con el posible papel anti-inflamatorio de la señalización Wnt canónica se ha demostrado que Dkk-1, antagonista de esta señal, está sobreexpresado en el tejido sinovial de ratones y en el suero de pacientes con artritis reumatoide, y que su expresión es inducida por TNF $\alpha$ . Puesto que la señalización Wnt canónica promueve la diferenciación de las células mesenquimales en osteoblastos promoviendo la formación del hueso, en pacientes con esta enfermedad, Dkk-1 impide la formación de nuevo hueso inhibiendo directamente la diferenciación y función de los osteoblastos (*Diarra y col. 2007; Polzer y col. 2008*).

Por su parte Wnt5a, considerado un ligando no canónico prototipo, ha sido repetidamente propuesto como una señal pro-inflamatoria. En este sentido, Wnt5a es detectado en el contexto de diferentes enfermedades inflamatorias como en las lesiones granulomatosas de pacientes con tuberculosis (*Blumenthal y col. 2006*), en el suero y médula ósea de pacientes con sepsis o shock séptico (*Pereira y col. 2008*), en las placas de ateroma de pacientes con aterosclerosis (*Christman y col. 2008; Kim y col. 2010*), en sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide (*Sen y col. 2000; Kim y col. 2010; Rauner y col. 2012*) y en las lesiones de pacientes con psoriasis (*Gudjonsson y col. 2010*). Además es producido por poblaciones como macrófagos (*Blumenthal y col. 2006; Pereira y col. 2008; Bilkovski y col. 2011*), células endoteliales, DCs (*Wu y col. 2007*) y células estromáticas de médula ósea (*Rauner y col. 2012*) en respuesta a situaciones inflamatorias o patógenos.

Es bien conocido el papel autocrino de Wnt5a en los macrófagos que incrementan su expresión y la de su receptor Fzd5, en respuesta a estímulos bacterianos (*Blumenthal y col. 2006*). De esta forma, en el contexto adecuado, Wnt5a induce en los macrófagos humanos la producción de citocinas pro-inflamatorias y está implicado en su activación (*Pereira y col. 2008; Schaale y col. 2011*). Además Wnt5a estimula la capacidad fagocítica de esta población aunque no promueve su actividad bactericida (*Maiti y col. 2012*). Wnt5a también es capaz de activar en líneas de células monocíticas procedentes de leucemias humanas (THP-1) la producción de quimioquinas y citocinas pro-inflamatorias, así como aumentar su adhesión a células endoteliales (*Kim y col. 2012*). Sin embargo, recientemente se ha visto *in vitro* que, bajo condiciones pro-inflamatorias, Wnt5a impide la diferenciación de los monocitos humanos en macrófagos pro-inflamatorios promoviendo, por el contrario, la diferenciación de macrófagos con actividad inmunosupresora (*Bergenfelz y col. 2012*). Los autores proponen que estos macrófagos serían similares a los monocitos CD14<sup>+</sup> presentes en pacientes con sepsis o a los macrófagos asociados a tumor (TAM) encontrados en las pacientes con carcinoma de mama (*Bergenfelz y col. 2012*).

Continuando con el papel pro-inflamatorio de Wnt5a, tanto las células endoteliales como los linfocitos T son también diana de su efecto. Así, Wnt5a participa en la activación de células endoteliales promoviendo la producción de citocinas pro-inflamatorias, lo que conduciría, en última instancia, al mantenimiento de los procesos de inflamación de forma sistémica (*Kim y col. 2010*). Por otra parte, los linfocitos T producen Wnt5a en respuesta a la quimioquina CXCL12 que, de forma autocrina, media su migración hacia los sitios de inflamación (*Ghosh y col. 2009*).

Respecto a la artritis reumatoide se ha propuesto que Wnt5a, cuya expresión está incrementada en el tejido sinovial de pacientes con esta enfermedad (*Sen y col. 2000; Kim y col. 2010; Rauner y col. 2012*), promueve su desarrollo puesto que al inhibir su señalización se reduce la producción de las citocinas pro-inflamatorias que contribuyen a la activación de los sinoviocitos en las articulaciones afectadas (*Sen y col. 2001; Sen 2005*).

Más recientemente, también ha sido demostrado que Wnt5a jugaría un papel en la obesidad, considerada una enfermedad inflamatoria crónica de intensidad leve. Wnt5a es secretado por los macrófagos que infiltran el tejido adiposo, que responden a él de forma autocrina incrementando la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Junto a este papel pro-inflamatorio, Wnt5a, además, sería mediador del desarrollo de la resistencia a la insulina por su capacidad para inducir la ruta no canónica que activa a JNK1 en los adipocitos. Estos modularían los niveles de Wnt5a activo produciendo el bloqueante soluble sFrp5. En condiciones de

obesidad el número de macrófagos en el tejido adiposo se incrementa y, además, los niveles de sFrp5 producidos por el adiposo se reducen (*Ouchi y col. 2010; Schulte y col. 2012*) lo que favorece tanto la inflamación como el desarrollo de la resistencia a la insulina. Es más, recientemente se ha demostrado que en el suero de pacientes con obesidad se detectan niveles elevados de Wnt5a (no detectable en individuos delgados). La restricción calórica en estos pacientes resulta en un incremento en los niveles de sFrp5 que cursa en paralelo con una mejoría en los problemas relacionados con la resistencia a la insulina (*Schulte y col. 2012*).

#### **4. SEÑALIZACIÓN WNT Y DCs**

Recientes evidencias apuntan a las proteínas Wnt y otros componentes de su ruta de señalización como importantes moduladores del sistema inmune participando en el balance entre tolerancia e inmunidad, siendo las DCs una de sus poblaciones diana (*Jiang y col. 2007; Zhou y col. 2009; Manicassamy y col. 2010; Hack y col. 2012*).

Como comentamos anteriormente,  $\beta$ -catenina se identificó originalmente como una proteína periférica de membrana que cumplía un papel crucial en las uniones adherentes donde interacciona con E-cadherina (*Valenta y col. 2012*). En condiciones de reposo, la mayor parte de la  $\beta$ -catenina es secuestrada por el dominio citoplásmico de E-cadherina, reduciéndose el reservorio de  $\beta$ -catenina libre en el citoplasma que puede ser fosforilada por GSK3 para su posterior degradación por el proteasoma (*Staal y Clevers 2005*). Jiang y colaboradores (2007) han demostrado que la ruptura de la adhesión mediada por E-cadherina en DCs derivadas de progenitores de médula ósea de ratón induce la activación de la ruta de  $\beta$ -catenina provocando un fallo en la maduración de las mismas. Estas DCs presentan un fenotipo que se ha calificado como “semimaduro” puesto que, aunque expresan ciertos marcadores de maduración, son incapaces de producir citocinas pro-inflamatorias. Consecuentemente, promueven la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> reguladores que inducen tolerancia tanto *in vitro* como *in vivo*. Se sugiere, por tanto, que la activación de la señalización E-cadherina/ $\beta$ -catenina podría ser uno de los mecanismos de generación de DCs tolerogénicas en estado estacionario (*Jiang y col. 2007; Fu y Jiang 2010*). También E-cadherina parece jugar un papel en la diferenciación de las LCs de la epidermis. En un modelo *in vitro* se ha demostrado que la E-cadherina expresada por los queratinocitos proporciona el ambiente necesario para la diferenciación de LCs a partir de monocitos, siendo indispensable la interacción entre E-cadherinas de ambas células para la obtención de células Langerina<sup>+</sup> (*Mayumi y col. 2012*).

Apoyando la idea de que la señalización a través de  $\beta$ -catenina media la inducción de DCs tolerogénicas, un trabajo del grupo del Dr. Bali Pulendran, de gran impacto en este ámbito, ha revelado que  $\beta$ -catenina juega un papel importante en el balance que establecen las DCs entre inmunidad y tolerancia en la mucosa intestinal del ratón (*Manicassamy y col. 2010*). En este trabajo demuestran que la delección de  $\beta$ -catenina en las células CD11c<sup>+</sup> de ratón conlleva una reducción en el número de células Treg y un aumento en la frecuencia de linfocitos Th1 y Th17 en el intestino pero no en el hígado. De hecho, en contraste con las DC esplénicas, la señalización Wnt está constitutivamente activa en las poblaciones de DCs intestinales y en los macrófagos del intestino de ratón. Las DCs intestinales deficientes en  $\beta$ -catenina producen menores niveles de citocinas anti-inflamatorias, promoviendo que estos ratones sean más susceptibles a desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal. Por lo tanto, los autores concluyen que la señalización a través de  $\beta$ -catenina promueve la diferenciación de las DCs hacia un estado tolerogénico limitando la respuesta inflamatoria (*Manicassamy y col. 2010*). No obstante, puesto que la delección de  $\beta$ -catenina se realiza bajo el promotor de CD11c, y éste también está activo en ciertas poblaciones de macrófagos, es posible que los macrófagos también contribuyan al mantenimiento de la tolerancia en el intestino mediada por  $\beta$ -catenina (*Murphy 2011*).

Más recientemente, Ke y colaboradores (2012) han mostrado en ratón que, durante la estimulación de DCs derivadas de progenitores de médula ósea, la estabilización de  $\beta$ -catenina mediada por STAT3 tiene un efecto negativo en su maduración y función. En contraste, la reducción de los niveles de esta proteína aumenta la actividad de NF- $\kappa$ B y el programa de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a LPS. No obstante, estos autores también observan que la activación de estas DCs en respuesta a LPS induce la estabilización de  $\beta$ -catenina, mediante la inhibición de GSK3. Por tanto, sugieren que  $\beta$ -catenina actúa modulando la maduración y función de las DCs, como mecanismo de regulación negativa de la respuesta inflamatoria dirigida por LPS-TLR4. Sin embargo estos autores no conectan la regulación de  $\beta$ -catenina con la activación de la ruta Wnt sino con la actividad de STAT3 (*Ke y col. 2012*).

Respecto al papel que juega la señalización Wnt canónica en la diferenciación de las DCs, Zhou y colaboradores (2009) describieron que es necesaria la cooperación entre la señal Notch y la señal Wnt canónica para la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos en DCs. En este trabajo demostraron que la señalización Notch en progenitores hematopoyéticos favorece su diferenciación hacia cDCs mediante la activación de la ruta de señalización Wnt canónica. Esta misma señal, en contraposición, reduce drásticamente la generación de pDCs. Asimismo demuestran que  $\beta$ -catenina es necesaria para la diferenciación de las DCs *in vitro*,

puesto que la inhibición de la expresión de esta proteína en los progenitores hematopoyéticos reduce el número de DCs generadas a partir de ellos (*Zhou y col. 2009*). Por el contrario, resultados previos de nuestro grupo ponen de manifiesto que la activación transitoria de la ruta Wnt canónica en los precursores tímicos humanos reduce su capacidad para diferenciar hacia DCs, incrementando la producción de NKs (*Valencia y col. 2010*). En esta misma línea, en un trabajo del grupo del Dr. Paul Kincade se observa cómo el cocultivo de progenitores hematopoyéticos de médula ósea de ratón con células estromáticas que sobreexpresan Wnt3a inhibe la diferenciación de pDCs, mientras que no modifica la generación de cDCs (*Malhotra y col. 2008*). En contraste, el cocultivo con células que sobreexpresan Wnt5a no modificaba la generación de los dos tipos de DCs. No obstante, más recientemente, un trabajo de este mismo grupo ha revelado que el efecto de Wnt3a no se produce directamente sobre los progenitores hematopoyéticos, si no que Wnt3a provoca alteraciones en las células estromáticas tales como la expresión de diferentes moléculas que le confieren características osteoblásticas. Por lo tanto sugieren que la señalización Wnt canónica influye sobre el nicho que sustenta la hematopoyesis (*Ichii y col. 2012*).

Continuando con la función de la señalización Wnt canónica en el desarrollo de las DCs, la adición de Wnt3a, en combinación con TGF $\beta$ 1, GM-CSF y M-CSF, a los cultivos de progenitores de médula ósea incrementa la proporción de LCs recuperadas, mientras que la inhibición de esta ruta mediada por Dkk1 reduce el número de LCs tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo que la señalización Wnt canónica influye en el desarrollo de las células de Langerhans en la piel (*Becker y col. 2011*).

La actividad de GSK3, inhibida tras la activación de la ruta Wnt canónica, influye profundamente en la diferenciación y maduración de las DCs. Sin embargo, los distintos estudios que demuestran este papel no lo asocian a la presencia de un ligando Wnt.

Diferentes trabajos han analizado las consecuencias de la inhibición farmacológica de GSK3 durante la diferenciación de las DCs a partir de monocitos humanos o progenitores de médula ósea de ratón obteniendo resultados contradictorios. Rodionova y colaboradores (2007) demostraron que este tratamiento impide la diferenciación de los monocitos a DCs desviándola hacia el linaje macrofágico, y produciendo células que mantienen la expresión de CD14, altamente fagocíticas, pero que no son capaces de producir IL-12 (*Rodionova y col. 2007*). Por el contrario, en un trabajo posterior, Liu y colaboradores (2011), usando este mismo modelo experimental, no observaron este bloqueo aunque no llevaron a cabo un estudio funcional de las células obtenidas (*Liu y col. 2011*). Por otra parte, Ono y colaboradores (2007), utilizando

progenitores de médula ósea de ratón, observaron que la inhibición de GSK3 durante su diferenciación en DCs no inhibe la generación de las mismas, pero conduce a importantes cambios en su fenotipo y función. Así estas DCs generadas en presencia de un inhibidor de GSK3 son más eficaces induciendo la diferenciación de células Th1 pero han perdido la capacidad para promover una respuesta Th2, lo que se asocia con una disminución en la producción de IL-6 en respuesta a CD40L. (*Ono y col. 2007*).

Asimismo, más recientemente se ha demostrado que GSK3 está constitutivamente activa en las DCs inmaduras (iDCs) aisladas de bazo y médula ósea de ratón en estado estacionario (*Alessandrini y col. 2011*) así como en las moDCs humanas (*Rodionova y col. 2007*). La actividad de GSK3 impide la maduración espontánea de las DCs, y su inhibición farmacológica resulta en el incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras y en la producción de IL-6, aunque no conlleve la adquisición de un fenotipo maduro (*Jiang y col. 2007; Rodionova y col. 2007; Alessandrini y col. 2011*).

La actividad de GSK3 se reduce tanto durante la activación normal de las DCs de bazo y médula ósea de ratón *in vitro* e *in vivo* (*Alessandrini y col. 2011*), como la de las moDCs humanas (*Rodionova y col. 2007*), lo que se traduce en un incremento de los niveles de  $\beta$ -catenina. No obstante, debe ser necesaria cierta actividad de esta enzima en el momento de la maduración de las DCs, puesto que su inhibición farmacológica durante la activación de las DCs bloquea la secreción de IL-12 y reduce la producción de otras citocinas pro-inflamatorias, como IL-6 y TNF $\alpha$  (*Rodionova y col. 2007*).

Además de regular la diferenciación y maduración de las DCs, GSK3 lleva a cabo otras funciones en la biología de las DCs. Por un lado, se comporta como una molécula pro-apoptótica en DCs maduras, cuya actividad se reduce por las señales desencadenadas tras la unión de CCR7 a sus ligandos (*Escribano y col. 2009*). Por otra parte, GSK3 regula la producción de IL-10 inducida por IFN- $\beta$  en moDC humanas (*Wang y col. 2011*). Su inhibición aumenta la producción de IL-10 por parte de las DCs, lo que estaría en relación con la idea, anteriormente comentada, de que la señalización Wnt canónica en las DCs jugaría un papel anti-inflamatorio (*Wang y col. 2011*).

Si nos centramos en el papel de Wnt5a en las DCs, un trabajo reciente muestra que Wnt5a inhibe la activación de las pDCs humanas, bloqueando el incremento en la expresión de CD80 y CD86, así como la producción de IFN $\alpha$  mediada por CpG (*Hack y col. 2012*). En este trabajo sugieren que Wnt5a puede ser uno de los factores inmunosupresores que producen las

células del melanoma que induce la inhibición la activación de las pDCs provocando el estado de anergia de esta población que se observa en estos pacientes (*Hack y col. 2012*).

## **OBJETIVOS**

## **Objetivos**

A la vista de los resultados existentes en la literatura, es evidente que los estudios acerca del papel de la señalización Wnt en la diferenciación y función de las DCs se han centrado en el modelo de ratón y en el uso de métodos indirectos para estudiar la señalización Wnt, tales como la inhibición farmacológica de GSK3 así como la estabilización o delección de  $\beta$ -catenina. Por otra parte, prácticamente todos estos trabajos estudian el papel que juega la señalización Wnt canónica en estas células.

Por todo ello, el objetivo global de nuestro trabajo será el análisis del papel de la señalización Wnt, tanto canónica como no canónica, en la diferenciación y función de las moDCs humanas. Concretamente estudiaremos:

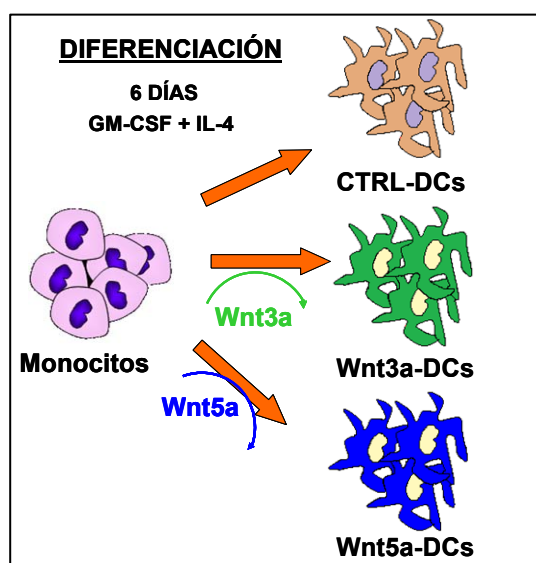
1. Expresión de receptores de ligandos Wnt durante el proceso de diferenciación y maduración de las moDCs humanas.
2. Efecto de la activación de la señalización Wnt, mediada por Wnt3a o Wnt5a, durante la diferenciación de los monocitos en DCs, analizando la morfología, fenotipo, capacidad funcional y perfil transcripcional de las DCs generadas.
3. Mecanismos celulares a través de los cuales las proteínas Wnt ejercen su función en la diferenciación de los monocitos a DCs.
4. Determinación de las posibles rutas de señalización que median el efecto de Wnt5a en el proceso de diferenciación de los monocitos a DCs.
5. Análisis del efecto de la activación de la señalización iniciada por Wnt5a en DCs antes y durante su estimulación.
6. Expresión de ligandos Wnt no canónicos durante la diferenciación y maduración de las DCs.
7. Papel autocrino y paracrino del Wnt5a producido por las DCs.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. Generación de DCs a partir de monocitos

Las células mononucleares de sangre periférica fueron obtenidas a partir de concentrados celulares, cedidos por el Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphocyte Isolation Solution, Rafer, España). Se aislaron monocitos CD14<sup>+</sup> mediante separación inmunomagnética utilizando anticuerpos anti-CD14 conjugados a esferas magnéticas (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). Los monocitos (>95%) fueron cultivados durante 6 días en placas de 48 pocillos a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml (500  $\mu$ l/pocillo) en medio AIM-V suplementado con 2 mM L-glutamina (Sigma-España), 20 ng/ml de GM-CSF y 20 ng/ml de IL-4 (ambos de Invitrogen; Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). Todos los cultivos se llevaron a cabo a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y cada 2 días la mitad del medio fue reemplazado por medio fresco atemperado.

Para analizar el efecto del incremento de la señal Wnt durante la diferenciación de las DCs se establecieron cultivos como los descritos anteriormente en presencia o ausencia de 100 ng/ml de Wnt3a o Wnt5a (ambos de Chemicon; Millipore Corporation, Billerica, MA, EEUU) (Esquema 5). Donde se indica, los monocitos fueron tratados con LiCl (10 $\mu$ M) (Sigma-España). En el caso de los cultivos en los que el tratamiento con Wnt5a se llevó a cabo únicamente durante las primeras 24 horas, en ese momento del cultivo todo el medio fue reemplazado por medio procedente de cultivos de monocitos en condiciones control. Tanto los cultivos control como los tratados con Wnt5a fueron sometidos a un proceso equivalente.



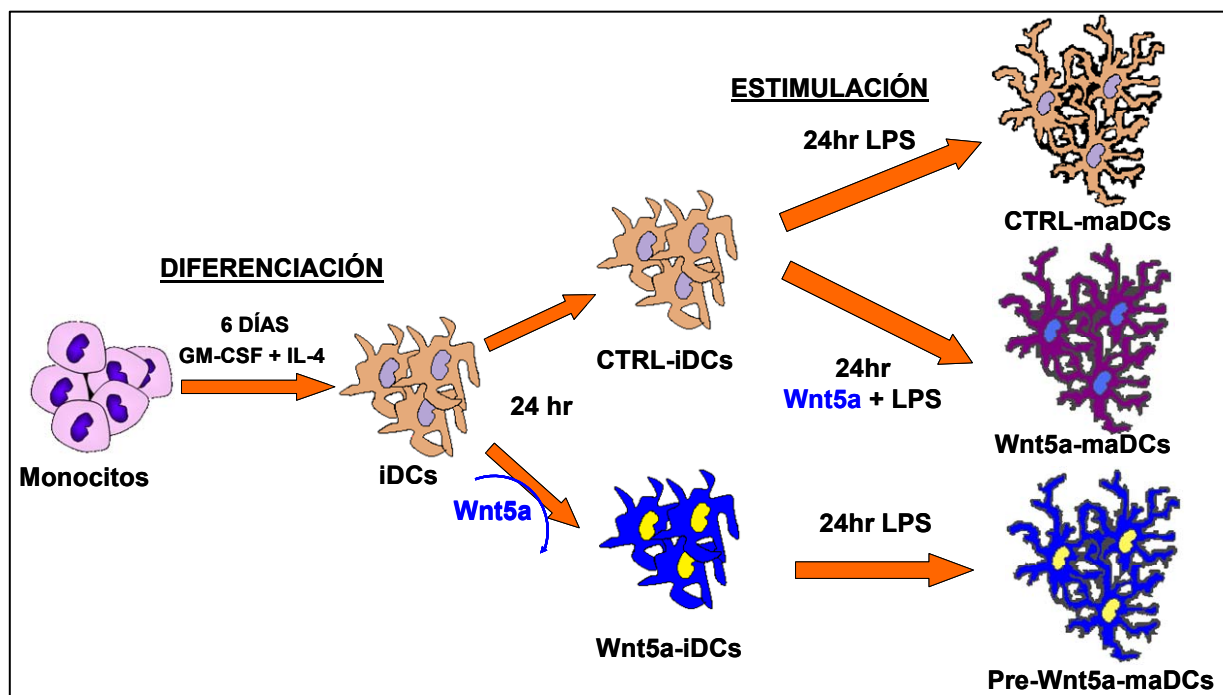
*Esquema 5. Incremento de la señalización Wnt durante el proceso de diferenciación de las moDCs. Monocitos humanos fueron cultivados durante 6 días con GM-CSF e IL-4 en ausencia de tratamiento (CTRL-DCs) o en presencia de 100ng/ml de Wnt3a (Wnt3a-DCs) o Wnt5a (Wnt5a-DCs).*

En un grupo de cultivos se inhibieron específicamente moléculas transductoras de la señal Wnt simultáneamente al tratamiento con Wnt5a durante 24 horas. Los inhibidores se añadieron a los monocitos 15 minutos antes de la adición del cóctel GM-CSF/IL-4 y el ligando Wnt. Tras las 24 horas de tratamiento, todo el medio de estos cultivos fue sustituido por medio procedente de cultivos establecidos en paralelo bajo condiciones control. A partir de este momento las células se mantuvieron hasta el día 6 en presencia del cóctel GM-CSF/IL-4. Los cultivos control de estos experimentos, llevados en paralelo, sufrieron también este tipo de manipulación. Los inhibidores empleados fueron los siguientes: CK59, inhibidor de CaMKII (1-50 $\mu$ M); SP600125, inhibidor de JNK (20 $\mu$ M); Go6983, inhibidor de PKC (5  $\mu$ M); o JSH-23, inhibidor de NF- $\kappa$ B (5-10  $\mu$ M) (todos de TOCRIS; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

## **2. Maduración de las DCs**

A los 6 días de cultivo se procedió, donde se indica, a la estimulación de la maduración de las DCs obtenidas. Tras retirar el medio en el que habían diferenciado las células, eliminando así, el GM-CSF/IL-4 o los posibles tratamientos que todavía se encontraran en el cultivo, se añadió medio atemperado suplementado con el estímulo madurativo correspondiente durante 24-48 horas. Se emplearon los siguientes agonistas TLR: LPS (100 ng/ml), Poly I:C (12,5  $\mu$ g/ml), FSL1 (100 ng/ml), ssRNA40 (1  $\mu$ g/ml), Pam3CsK (250 ng/ml) y Flagelina (500 ng/ml ) (todos de Invivogen, San Diego, CA, EEUU). Asimismo, donde se indica se utilizó CD40L (1  $\mu$ g/ml) (Prospec-Tany TechnoGene Ltd, East Brunswick, NJ, EEUU), TNF $\alpha$  (10ng/ml) (Invitrogen) o un cóctel de citocinas compuesto por IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-6 (15 ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml) (las tres de Invitrogen) y PGE2 (1  $\mu$ g/ml) (Sigma-España).

En un grupo de experimentos, las DCs inmaduras obtenidas como se describe en el apartado 1 fueron tratadas con 100 ng/ml de Wnt5a durante 24 horas. Tras eliminar del medio el Wnt5a y citocinas sobrantes como se describe en el apartado anterior, se añadió LPS (100 ng/ml) para inducir su maduración. Los cultivos control sufrieron el mismo tratamiento. Donde se indica se añadió 100 ng/ml de Wnt5a simultáneamente al estímulo con LPS (Esquema 6).



**Esquema 6. Incremento de la señal Wnt5a antes y durante la maduración de las DCs.** Monocitos humanos fueron cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4 para inducir su diferenciación a DCs. Tras 6 días de cultivo las DCs inmaduras (iDCs) recuperadas fueron tratadas con 100 ng/ml de Wnt5a durante 24 horas (Wnt5a-iDCs) o mantenidas en condiciones control (CTRL-iDCs). A continuación se estimularon durante 24 horas las CTRL-iDCs, con LPS sólo (CTRL-maDCs) o en combinación con Wnt5a (Wnt5a-maDCs). Las Wnt5a-iDCs también fueron estimuladas con LPS obteniéndose DCs maduras que habían sido previamente tratadas con Wnt5a (Pre-Wnt5a-maDCs).

### 3. Silenciamiento de Wnt5a en iDCs

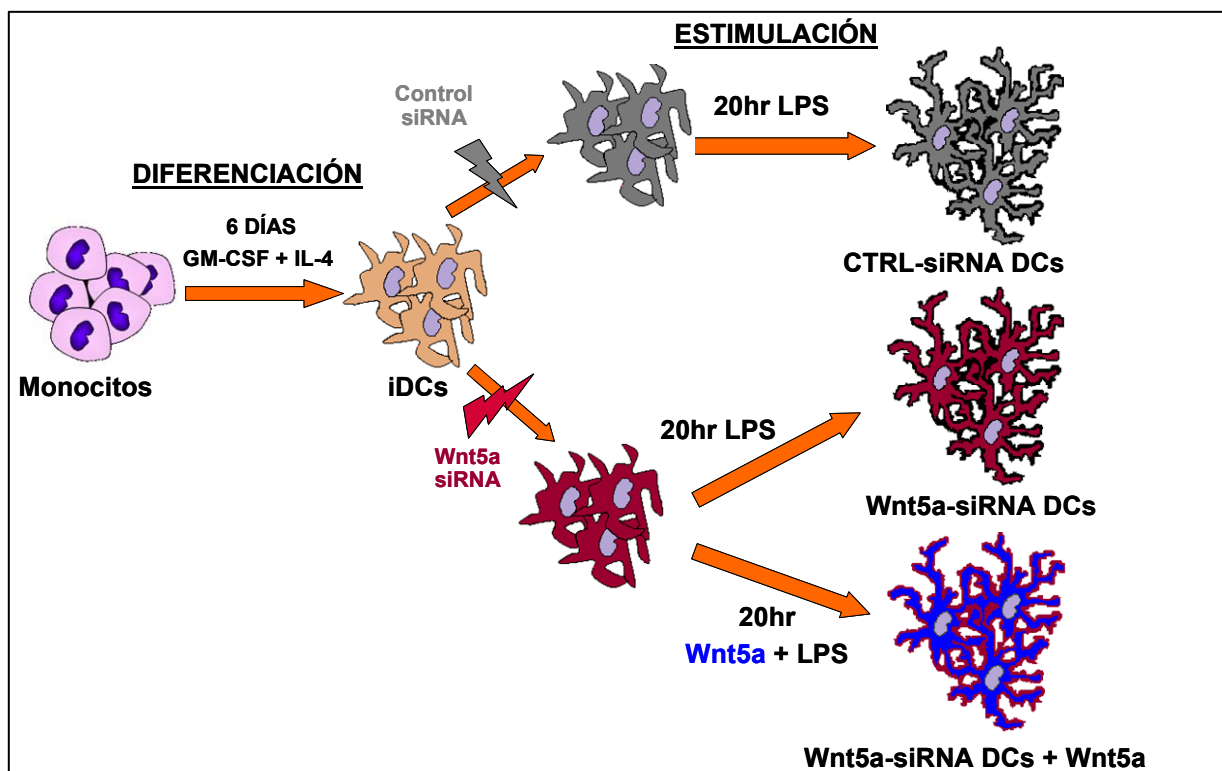
Para llevar a cabo el silenciamiento de la expresión de Wnt5a en las iDCs utilizamos ARN pequeños de interferencia (siRNA) (*Silencer*<sup>®</sup> Select Pre-Designed & Validated siRNA de Ambión; Life Technologies) diseñados con las últimas tecnologías que permiten una alta eficiencia, potencia y especificidad. Como método de transfección utilizamos la técnica de Nucleofección<sup>®</sup>, usando el kit P3 Primary Cell 4D-Nucleofector<sup>®</sup> X Kit y el Amaxa 4D-Nucleofector<sup>™</sup> (ambos de Lonza Hopkinton, MA, EEUU). La tecnología de la Nucleofección<sup>®</sup> consiste en la creación momentánea de pequeños poros en la membrana de las células aplicando un pulso eléctrico. Además los programas del Nucleofector<sup>™</sup> y las soluciones específicas para cada tipo celular permiten no sólo la entrada de los siRNA al citoplasma, sino también su entrada en el núcleo a través de la membrana nuclear. Esto permite una alta eficacia de transfección y hace que el éxito de la transfección sea independiente de la proliferación.

En todos los experimentos se llevaron a cabo los siguientes controles:

- Control de transfección (Mock): células sometidas al proceso de nucleofección pero en ausencia de un siRNA. El análisis de estas células indica si el proceso de transfección resulta citotóxico o si produce otro efecto inespecífico.
- Control siRNA negativo: Usamos un siRNA no específico, es decir, que no tiene un gen diana en el tipo celular que vamos a silenciar. El estudio de estas células nos sirve para diferenciar el efecto específico del silenciamiento del gen diana, de los posibles efectos inespecíficos que se pueden producir por la entrada de un siRNA dentro de la célula. En nuestro caso utilizamos el *Silencer*® Select Negative Control siRNA#1 (Life Technologies) a la misma concentración que el siRNA específico.

En ningún caso encontramos diferencias entre el siRNA negativo y el control mock, por lo que en nuestros resultados siempre haremos referencia al control siRNA negativo.

Para el silenciamiento de Wnt5a se probaron 2 siRNA (s14872, s14873) (Ambion). Asimismo, se probaron varias concentraciones de siRNA para conseguir las condiciones óptimas de silenciamiento (250-300nM). Una vez puesta a punto la técnica, en todos los experimentos se utilizó el siRNA s14872 a 300nM.



**Esquema 7. Silenciamiento de Wnt5a en DCs.** Monocitos humanos fueron cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4 para inducir su diferenciación a DCs. Tras 6 días de cultivo las DCs recuperadas fueron transfectadas por nucleofección con un siRNA específico para Wnt5a (Wnt5a-siRNA) o con un siRNA irrelevante (CTRL-siRNA). Tras 20 horas de estimulación con LPS (100ng/ml) se obtuvieron las Wnt5a-siRNA DCs y las CTRL-siRNA DCs, respectivamente. Donde se indica se añadió Wnt5a a los cultivos a la vez que el estímulo madurativo obteniéndose así las Wnt5a-siRNA DCs + Wnt5a.

Los cultivos de diferenciación de DCs para estos experimentos fueron llevados a cabo en presencia de 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco; Life Technologies) para incrementar la viabilidad de las células que eran sometidas al proceso de silenciamiento. Tras 6 días de cultivo las iDCs obtenidas fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS) al 0.5% BSA. A continuación cada grupo experimental por separado fue resuspendido en 100 µl de solución de nucleofección y se le añadió el siRNA específico antes de ser transferido a una cubeta de nucleofección, suministrada en el kit. Inmediatamente después de la nucleofección se añadió a cada cubeta RPMI-1640 al 10% SFB suplementado con 2 mM L-glutamina, 1mM piruvato sódico, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Sigma-España), que a partir de ahora llamaremos medio RPMI al 10% SFB completo. El medio estaba previamente atemperado a 37°, y las células se repartieron cuidadosamente en placas de 24 pocillos de fondo plano a  $1 \times 10^6$  células /ml/pocillo. Tras 3 horas de cultivo a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, se añadió el estímulo madurativo, LPS (100 ng/ml) y, en algunos experimentos, el ligando Wnt5a (100 ng/ml) (Esquema 7). Tras 20 horas de cultivo se valoró la viabilidad de las células obtenidas mediante doble tinción con yoduro de propidio y Anexina V. Los experimentos en los que las células control no mostraron una viabilidad adecuada (mayor del 70%) fueron descartados. Esta situación sólo tuvo lugar en uno de los 8 experimentos realizados. Asimismo, se analizó por PCRq los niveles de transcrito de Wnt5a para confirmar y valorar el nivel del silenciamiento de este gen.

#### **4. Aislamiento de linfocitos T CD4 *naive***

A partir de células mononucleares obtenidas de concentrados celulares mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphocyte Isolation Solution), se aislaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive* por selección negativa mediante separación inmunomagnética utilizando el kit *Naive CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation II* (Miltenyi Biotech). Brevemente, las células mononucleares fueron marcadas con un coctel de anticuerpos biotinados contra moléculas no expresadas por los linfocitos T CD4 *naive* (CD19, CD8, CD56, CD45RO CD14 y CD15, entre otros) durante 10 minutos a 4° C y tras un lavado con PBS se incubaron con anticuerpos anti-biotina cojugados a esferas magnéticas durante 20 minutos a 4° C. A continuación se hizo pasar la suspensión celular a través de una columna de separación magnética colocada en un imán (Miltenyi Biotech) obteniéndose así los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive*.

## **5. Reacción linfocitaria mixta (MLR)**

DCs que habían sido activadas con distintos ligandos TLR durante 24 horas, como se describe en el apartado 2, fueron utilizadas como estimuladoras de células T CD4<sup>+</sup> *naive* alogénicas aisladas de sangre periférica de donantes sanos, como se describe en el apartado anterior. Los cocultivos se llevaron a cabo en un ratio 1:10 DC/célula T ( $1,5 \times 10^4 / 1,5 \times 10^5$ ) en placas de 96 pocillos con fondo plano en medio RPMI al 10% SFB completo.

## **6. Activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive* vía CD3/CD28**

Para la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive*, aislados según se describe en el apartado 4, se recubrieron los pocillos donde se iban a cultivar estas células con anticuerpos anti-CD3 (10 µg/ml) (NA/LE, BD Bioscience San Diego, CA, EEUU) diluido en PBS, durante al menos 1,5 horas. Antes de cultivar los linfocitos T, se lavaron tres veces los pocillos con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. En el momento del cultivo se añadieron anticuerpos anti-CD28 (4µg/ml) (NA/LE, BD Bioscience,) a las células en suspensión. Los linfocitos fueron cultivados hasta 6 días en RPMI al 10% de SFB completo a una concentración de  $2-3 \times 10^5$  células /pocillo en 200µl. Para analizar el efecto del incremento de la señal Wnt5a durante la activación de estas células se añadió a los cultivos 100 ng/ml de Wnt5a.

## **7. PCR cuantitativa a tiempo real**

La extracción de las muestras de ARN se llevó a cabo utilizando un kit específico para extracción de ARN total (*Absolutely RNA Microprep kit*; Stratagene cloning Systems, La Jolla, CA, EEUU) en cuyo protocolo incluye un paso de digestión con ADNasa I que evita la contaminación con ADN genómico. Los ADN complementarios (ADNc) fueron sintetizados con el kit *High capacity cDNA Reverse transcription* (Applied Biosystems; Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos ADNc fueron usados como dianas para la amplificación por PCR.

Para los análisis por PCR cuantitativa (PCRq) se utilizaron los siguientes ensayos TaqMan: PU.1 (Hs00231368\_m1), ETS1 (Hs00428287\_m1), ID2 (Hs00747379\_m1), ID3 (Hs00171409\_m1) IRF1 (Hs00971965\_m1), IRF2 (Hs01082884\_m1), IRF3 (Hs01547282\_m1), IRF4 (Hs01056534\_m1), IRF8 (Hs00175238\_m1), SOCS1 (Hs00864158\_g1), SOCS3 (Hs01000485\_g1), TLR1 (Hs00413978\_m1), TLR2 (Hs01872448\_s1), TLR3 (Hs00152833\_m1), TLR4 (Hs00152939\_m1), TLR5 (Hs00152825\_m1), TLR6

(Hs00271977\_s1), TLR8 (Hs00607866\_m1), Fzd1 (Hs00268943\_s1), Fzd2 (Hs 00361432\_s1), Fzd3 (Hs00184043\_m1), Fzd4 (Hs00201853\_m1), Fzd5 (Hs00361869\_g1), Fzd7 (Hs00275833\_m1), ROR1 (Hs00178178\_m1), ROR2 (Hs00171695\_m1), Ryk (Hs00243196\_m1), Wnt4 (Hs01573504\_m1), Wnt5a (Hs00998537\_m1) y Wnt11 (Hs00182986\_m1) todos ellos suministrados por Applied Biosystems. Asimismo, como control endógeno se utilizó GAPDH (Hs99999905\_m1) o RPLP0 (Hs00929873\_m1). Todas las reacciones de PCR fueron realizadas por duplicado usando la TaqMan Gene expression PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones, detecciones y análisis fueron realizados en un 7.900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, UCM).

### **8. Análisis fenotípico mediante citometría de flujo**

La determinación de marcadores de superficie se realizó sobre suspensiones celulares de  $0,5-1 \times 10^5$  células con concentraciones saturantes de anticuerpos monoclonales (mAbs) conjugados a un fluorocromo (FITC, PE, PE-Cy5 o APC).

Cuando el anticuerpo no estaba conjugado directamente a un fluorocromo, tras la incubación del primer anticuerpo purificado se añadió un anticuerpo (fragmentos F(ab)<sub>2</sub>), preabsorbido con suero humano, frente a IgG de la especie en la que estaba hecho el anticuerpo primario y conjugado a un fluorocromo (FITC, PE, o APC – Jackson ImmunoResearch Laboratories, Pennsylvania, PA, EEUU). Como controles negativos se emplearon, en el caso de anticuerpos directamente conjugados a fluorocromos, mAbs irrelevantes del mismo isotipo y especie que el utilizado en cada caso (BD Biosciences) y, en el caso de anticuerpos indirectos, el mismo anticuerpo secundario en ausencia del primario.

Para evitar uniones inespecíficas, previo al marcaje con un mAb específico, se llevó a cabo una incubación de 5 minutos con un reactivo que bloquea la unión de la fracción constante (Fc) de los mAb a los receptores de Fc presentes en la superficie de las células (Miltenyi Biotech). Todas las incubaciones se realizaron en PBS al 0,1% SFB y 1% EDTA a 4° C durante 30 minutos y posteriormente se lavaron (5 minutos, 750g, 4° C) en el mismo buffer.

Siempre que las condiciones experimentales lo permitieron se analizaron  $2-5 \times 10^4$  eventos en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) del Centro de Microscopía y Citometría de la UCM. Los datos fueron analizados con el software FCS Express V3.

### **9. Valoración de los niveles de proteínas intracelulares por citometría de flujo**

Para llevar a cabo los marcajes intracelulares las células fueron tratadas con la solución Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 20 minutos a 4° C, lavadas con el tampón Perm Wash (BD Biosciences) y marcadas con los correspondientes anticuerpos diluidos en este mismo tampón (30 minutos 4° C). Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo FACScalibur.

### **10. Valoración de los niveles de fosforilación de proteínas intracelulares**

En el caso de la detección de moléculas fosforiladas, las células fueron tratadas con la solución Cell Fix (BD Biosciences) durante 30 minutos a 4° C, lavadas con PBS y tratadas con el tampón Perm Buffer III (BD Biosciences) (previamente enfriado a -20° C) durante 30 minutos a 4° C, para evitar la acción de fosfatasas. A continuación, fueron marcadas con los correspondientes anticuerpos (30 minutos 4° C). Las células fueron analizadas del mismo modo que los marcajes de membrana.

### **11. Anticuerpos utilizados en el estudio citofluorimétrico**

En el presente estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos: CD3 (33-2A3), CD14 (M5E2), (Immunostep S.L, Salamanca, España), CD1a (HI149), HLA-DR (G46-6), CD40 (5C3), CD80 (L307.4) (BD Biosciences); CD25 (BC96), CD83 (HB15e), CD86 (IT2.2), CD197/CCR7 (TG8), CD206/MMR (15-2), CD209/DC-SIGN (9E9A8), CD273/PD-L2 (24F.10C12), CD274/PD-L1 (29E.2A3), CD324/E-Cadherina (67A4) (Biolegend, San Diego, CA, EEUU).

Los anticuerpos dirigidos contra antígenos intracitoplásmicos utilizados en el presente estudio han sido: anti-phosphoSTAT5 (Tyr<sup>694</sup>), anti-phosphoSTAT6 (Tyr<sup>641</sup>), anti-β-catenina, anti-IFN $\gamma$  (25723.11) (BD Biosciences); anti-phosphoCaMKII $\alpha$  (Thr<sup>286</sup>), anti-IRF1, anti-IRF8, anti-ID3 y anti-SOCS3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU).

### **12. Determinación de los niveles de apoptosis**

La proporción de células apoptóticas presentes en los cultivos fue determinada mediante un ensayo de unión de Anexina-V-FITC (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Brevemente, las células fueron lavadas con una solución de tampón HEPES (10mM, NaCl 140mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM; pH 7,4), incubadas durante 20 minutos a 4°C con una solución que

contenía yoduro de propidio (IP) y Anexina-V (Anex V) conjugada con FITC e inmediatamente después, analizadas por citometría de flujo. Se consideraron células apoptóticas aquellas  $Anex V^+ IP^-$ . En todos los casos al menos  $3 \times 10^4$  células fueron analizadas. Para determinar el porcentaje de células viables se consideró las células  $Anex V^- IP^-$ .

### **13. Ensayos de proliferación celular**

Se utilizó el método de dilución de CFSE como ensayo para medir la proliferación linfocitaria. Para ello, previo a su cocultivo con DCs, los linfocitos T  $CD4^+$  naive fueron marcados con CFSE 5  $\mu M$  (Sigma-España) durante 5 minutos a temperatura ambiente, y a continuación fueron lavados con PBS 5% SFB dos veces, y una última vez con medio RPMI al 10% SFB completo. Tras 6-7 días de cocultivo, se analizó la disminución en la fluorescencia de CFSE en las células  $CD3^+$  mediante citometría de flujo.

### **14. Cuantificación de la producción de citocinas**

Los sobrenadantes de los cultivos de maDC, de los cocultivos DCs/ linfocitos T y de los cultivos de linfocitos T  $CD4^+$  activados vía  $CD3/CD28$  fueron recogidos tras 24-48 horas de estimulación, tras 6-7 días de cocultivo y tras 6 días de activación, respectivamente, y fueron utilizados para determinar la secreción de diferentes citocinas. Los niveles de IL-2, IL-12p70,  $IFN\gamma$ , IL-10, IL-4,  $TNF\alpha$  e IL-8 fueron analizados usando kits específicos ELISAMAX (Biolegend), mientras que la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A y  $TGF\beta$  fue medida utilizando ensayos CBA (BD Biosciences).

### **15. Detección de citocinas intracelulares por citometría de flujo**

Tras 6-7 días de cultivo, los linfocitos T fueron recuperados y reactivados, de manera TCR independiente, para promover la producción de citocinas. Se utilizó PMA (20 ng/ml) e ionomicina (1  $\mu M$ ) (ambos de Sigma-España) para promover su activación a través de PKC e incrementar directamente los niveles de  $Ca^{+2}$  intracelular, respectivamente. Por otra parte, se añadió brefeldin A (20  $\mu g/ml$ ) (Biolegend) para bloquear el transporte de las citocinas al exterior de las células. Tras 5-6 horas de incubación se llevó a cabo el marcaje citoplásmico según se describe en el apartado 9.

## **16. Ensayos de endocitosis**

Para estudiar la capacidad de captar antígenos de las iDCs, se llevaron a cabo estudios de endocitosis mediada por receptor y de captación inespecífica por endocitosis de fase fluida. Para ello iDCs obtenidas como se describe en el apartado 1 fueron incubadas durante 45 min con 40KDa FITC-dextrano (100-500 µg/ml) o 1mg/ml de *Lucifer Yellow* (Sigma-Aldrich) a 37° C. Como control se incubaron las mismas células con los mismos tratamientos a 0° C. Tras la incubación con productos exógenos, se midió la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo.

## **17. Inmunofluorescencia**

Para el análisis por inmunofluorescencia se cultivaron monocitos humanos promoviendo su diferenciación a DCs como hemos descrito en el apartado 1, pero utilizando en este caso *chamber slides* con pocillos de 0.8 cm<sup>2</sup> (Thermo Fisher Scientific). Las células adherentes fueron fijadas *in situ*, se permeabilizaron usando la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) y se marcaron de manera secuencial con anticuerpos anti-HLA-DR (BD Biosciences), y anti-IgG de ratón conjugado a Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Se usó Hoechst 33258 (0,1 µg/ml) como marcador nuclear, incubándose durante 2 minutos.

Las muestras fueron montadas con Prolong Gold (Invitrogen) y observadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2 (Zeiss Oberkochen, Alemania) del Centro de Microscopía y Citometría de la UCM. La adquisición de las imágenes se realizó utilizando el programa Metamorph 6.0 (Molecular Devices, Chicago, EEUU).

## **18. Análisis estadístico**

Todos los datos mostrados en el presente trabajo son la media de, al menos, tres experimentos distintos. Las significaciones estadísticas de las diferencias entre medias fueron determinadas mediante un contraste T con los siguientes niveles de significación: \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$ .

## **RESULTADOS**

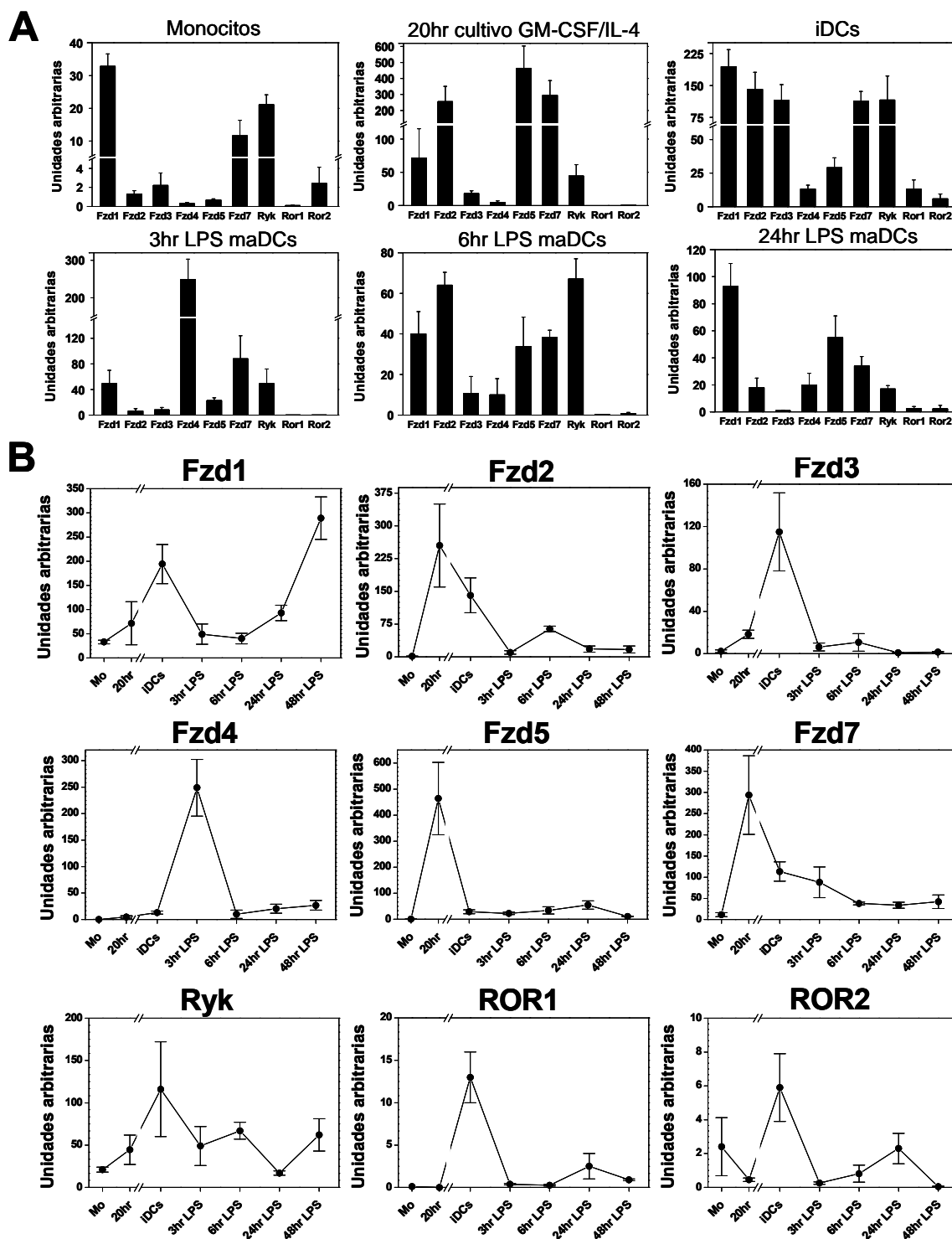
## **1. LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LIGANDOS WNT SE REGULA DURANTE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE LAS moDCs**

La cascada de señalización iniciada por un ligando Wnt va a depender en gran medida del repertorio de receptores que para dicho ligando exprese una célula en un momento concreto de su ciclo de vida (*van Amerongen 2012*). Con el fin de conocer a través de qué receptores podrían ejercer su función las proteínas Wnt durante la diferenciación y maduración de las moDCs, analizamos durante el ciclo de vida de estas células el patrón de expresión de diferentes receptores para ligandos Wnt, tanto los receptores Fzd1, Fzd2, Fzd3, Fzd4, Fzd5 y Fzd7 como los receptores no convencionales Ryk, ROR1 y ROR2.

El estudio por PCR cuantitativa reveló que los monocitos humanos de sangre periférica expresaban bajos niveles de ARNm de la mayor parte de los receptores estudiados, siendo Fzd1 el receptor más expresado en estas células (Fig.1A). Durante las primeras 20 horas de diferenciación de los monocitos en DCs se indujo fuertemente la transcripción de Fzd2, Fzd5 y Fzd7. Destacaba Fzd5 cuya expresión, durante este corto espacio de tiempo, llegó a multiplicarse por 400 (Mo:  $0,7 \pm 0,1$ ; 20hr diferenciación DCs:  $464 \pm 139$ ), siendo en estas etapas iniciales de la diferenciación de las DCs cuando encontramos sus niveles más altos. Asimismo, en este periodo, Fzd1, Fzd3 y Ryk mostraron un incremento moderado de su expresión, mientras que la expresión de Fzd4 se mantuvo baja y la de ROR1 y ROR2 fue prácticamente indetectable (Fig. 1A y 1B).

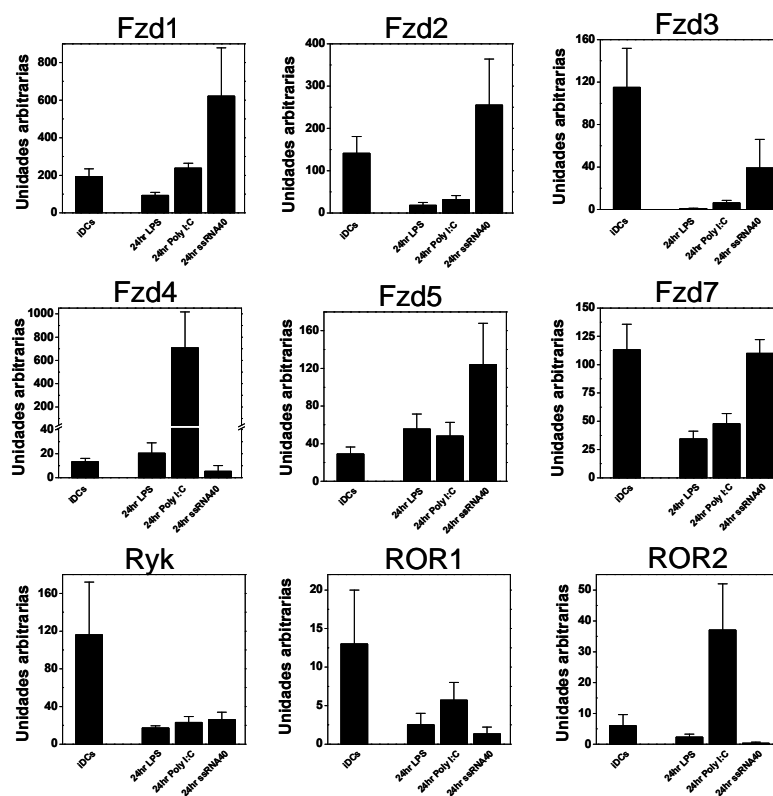
En las DCs inmaduras, obtenidas tras seis días de cultivo, la cantidad de transcrito de Fzd2 y Fzd7 se redujo frente a lo observado a las 20 horas de iniciar el proceso de diferenciación, pero se mantenían en niveles similares a Fzd1, Ryk y Fzd3 que por el contrario aumentaron en este periodo. Sin embargo, la transcripción de Fzd5 cayó notablemente equiparándose a los niveles de transcrito de Fzd4, ROR1 y ROR2 (Fig. 1A y 1B).

El proceso de maduración también modificó la expresión de los diferentes receptores para proteínas Wnt estudiados. En respuesta al ligando de TLR4, LPS, la transcripción de Fzd2 y Fzd3 se redujo de forma significativa durante las primeras 3 horas de estimulación, y sus niveles se mantuvieron bajos a lo largo de todo el periodo de maduración, como ocurría con la transcripción de Fzd5, Fzd7 y los receptores no convencionales estudiados. Sin embargo, Fzd1 y Fzd4 mostraron una cinética diferente. La expresión de Fzd1 se redujo drásticamente en



**Figura 1. Expresión de receptores para ligandos Wnt durante el proceso de diferenciación y maduración de.** Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de transcrito de diferentes receptores para proteínas Wnt durante el proceso de diferenciación (monocitos, 20 horas tras el inicio del proceso de diferenciación y DCs inmaduras-iDCs-) y maduración (3, 6, 24 y 48 horas tras estimulación con 100ng/ml de LPS-maDCs-) de moDCs. (A) Cada gráfica muestra la expresión de los distintos receptores en un momento concreto del proceso de diferenciación o maduración de las DCs. (B) Cinética de expresión de cada receptor a lo largo de este proceso. La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de GAPDH que fue utilizado como control endógeno. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 4 a 7 experimentos independientes. Nótese el corte en el eje Y y el cambio de escala después del corte en las gráficas de (A) y el corte en el eje X y cambio de escala en las gráficas de (B).

respuesta al estímulo madurativo aunque de forma transitoria puesto que a las 48 horas sus niveles no sólo se recuperaban sino que superaban a los observados en las DCs inmaduras. En el caso de Fzd4 su transcripción se indujo transitoriamente durante las primeras horas de estímulo reduciéndose después hasta niveles tan bajos como los que observábamos en las DCs inmaduras (Fig. 1A y 1B).



**Figura 2. Expresión de receptores para ligandos Wnt en las DC inmaduras y tras su maduración con distintos estímulos TLR.** Los niveles de transcrito de diferentes receptores para proteínas Wnt fueron determinados por PCR a tiempo real en DCs inmaduras (iDCs) y DCs maduras tras 24 horas de estímulo con LPS (100ng/ml), PolyI:C (12,5µg/ml) o ssRNA40 (1 µg/ml). La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de GAPDH que fue utilizado como control endógeno. Los datos representan la media  $\pm$  SD de al menos 4 experimentos independientes. Nótese el corte en el eje Y y el cambio de escala después del corte en la gráfica de Fzd4.

Analizamos también el perfil de expresión de estos receptores en DCs maduras obtenidas tras ser estimuladas 24 horas con otros ligandos TLR, demostrando que los distintos estímulos estudiados dan lugar a DCs maduras con una batería diferente de receptores para proteínas Wnt (Fig. 2). Observamos que sólo Fzd3, Ryk y ROR1, regulaban su expresión del mismo modo, independientemente del estímulo utilizado, reduciéndose en todos los casos. Con respecto al resto de receptores, las DCs estimuladas con Poly I:C vía TLR3 presentaban niveles altos de Fzd4 y ROR2, superiores a cualquiera de los detectados en las diferentes muestras analizadas.

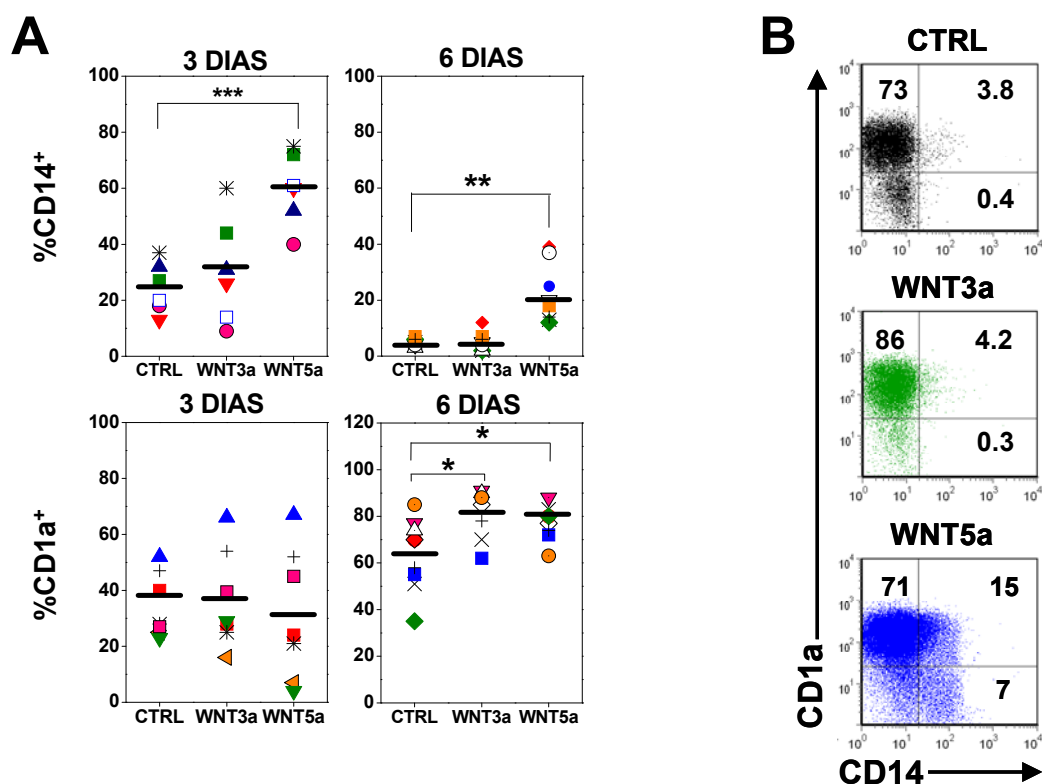
Por su parte, las DCs estimuladas con ssRNA40 vía TLR8 no sólo mantenían la expresión de Fzd7 respecto a las DCs inmaduras, sino que presentaban niveles más altos de Fzd1, Fzd2 y Fzd5 (Fig.2). Por tanto, estos datos nos sugerían que una diferente sensibilidad o capacidad de respuesta a las proteínas Wnt podría añadirse a las diferencias fenotípicas y funcionales que existen entre las DCs que han madurado en respuesta a distintos estímulos.

## **2. WNT5a MODIFICA LA DIFERENCIACIÓN DE LOS MONOCITOS HACIA DCs CON CARACTERÍSTICAS TOLEROGÉNICAS**

### **2.1 Las proteínas Wnt interfieren en la diferenciación de los monocitos humanos en DCs inmaduras**

Puesto que nuestros datos, así como la bibliografía (*Tickenbrock y col. 2006; Lehtonen y col. 2007*) mostraban que los monocitos humanos expresan diferentes receptores para proteínas Wnt, y que su expresión se modula durante el proceso de diferenciación de los mismos hacia DCs, decidimos estudiar el posible papel de la señalización Wnt durante este proceso. Para ello, llevamos a cabo cultivos de monocitos humanos, aislados de sangre periférica, en un medio libre de suero suplementado con GM-CSF e IL-4, citocinas necesarias y suficientes para la diferenciación de los monocitos hacia DCs (*Sallusto y Lanzavecchia 1994; Zhou y Tedder 1996*). A estos cultivos les añadimos, desde el primer día, 100 ng/ml de Wnt3a o Wnt5a, ligandos típicamente considerados como canónico y no canónico, respectivamente (*van Amerongen; van Amerongen 2012*).

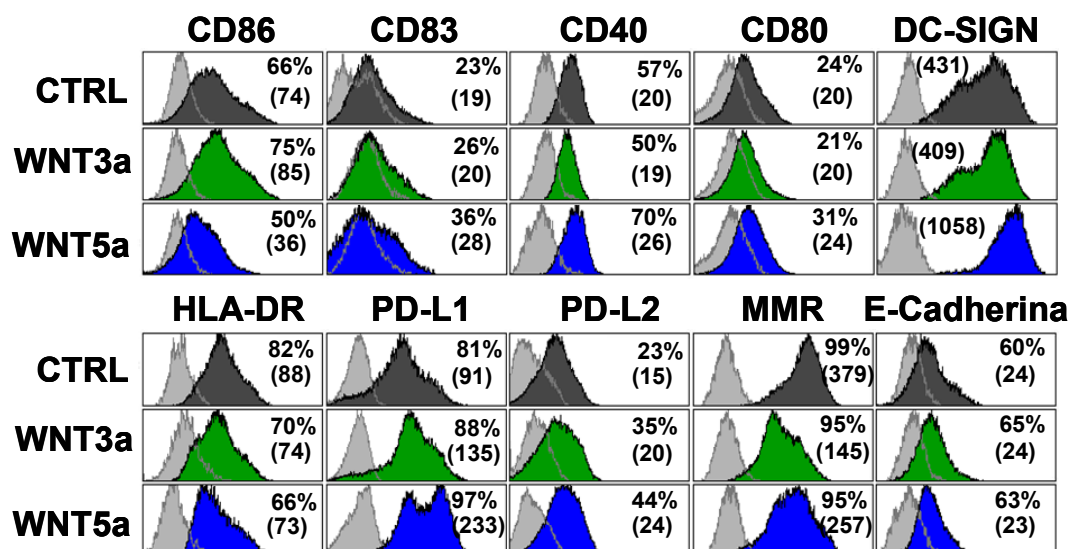
La adición de proteínas Wnt a los cultivos no modificó significativamente el número total de células recuperadas, ni la viabilidad de las mismas, esta última cuantificada mediante un ensayo de unión de Anexina V (datos no mostrados). No obstante, observamos importantes modificaciones en el fenotipo de las células obtenidas, siendo más importantes los cambios observados en las células diferenciadas en presencia de Wnt5a. Así, el ligando canónico, Wnt3a, incrementó ligeramente el porcentaje de células CD1a<sup>+</sup> recuperadas en todos los experimentos analizados, mientras que no modificó significativamente la expresión de CD14 (Fig. 3A y 3B). Sin embargo, el ligando no canónico, Wnt5a, aunque también aumentó el número de células CD1a<sup>+</sup>, inhibió la pérdida de expresión de CD14 que se produce durante el proceso normal de diferenciación de los monocitos a DCs. De esta forma, tras 6 días de cultivo entre un 10-40% de las células recuperadas de los cultivo tratados con Wnt5a expresaban niveles bajos de CD14 aunque eran mayoritariamente CD1a<sup>+</sup> (Fig. 3A y 3B).



**Figura 3. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD14 y CD1a en las DCs que habían diferenciado en presencia o ausencia de proteínas Wnt.** Monocitos humanos fueron cultivados durante 6 días con GM-CSF/IL-4 tanto en ausencia como en presencia de Wnt3a (100 ng/ml) o Wnt5a (100 ng/ml). (A) En la figura se muestra el porcentaje de células CD14<sup>+</sup> o CD1a<sup>+</sup> recuperadas tras 3 o 6 días tanto de los cultivos control (CTRL) como de los cultivos tratados con proteínas Wnt (n= 6-8). Cada símbolo representa un donante y los valores medios se indican con una línea horizontal (B) Fenotipo de las iDCs recuperadas a 6 días de cultivo. Las células recuperadas tras 6 días de cultivo fueron marcadas con anticuerpos específicos para los marcadores CD14 y CD1a, y analizadas por citometría de flujo. Los diagramas de puntos mostrados corresponden a un experimento representativo de 8 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$ .

Un análisis más profundo del fenotipo de las Wnt5a-DCs nos reveló un importante incremento en los niveles de expresión en superficie de DC-SIGN, PD-L1 y PD-L2, que iba acompañado de un ligero aumento en la expresión de CD40 y una reducción en la expresión de HLA-DR, CD86 y MMR. Sin embargo, la expresión de E-Cadherina, CD80 y CD83 apenas se vio afectada (Fig. 4) (Tabla 1).

El tratamiento con Wnt3a produjo un menor impacto en el fenotipo de las DCs recuperadas en comparación con el efecto inducido por Wnt5a. Las Wnt3a-DCs mostraban niveles de expresión muy similares a los encontrados en las CTRL-DCs para la mayor parte de los marcadores estudiados excepto para HLA-DR y MMR cuyos niveles estaban notablemente reducidos (Fig. 4) (Tabla 1).

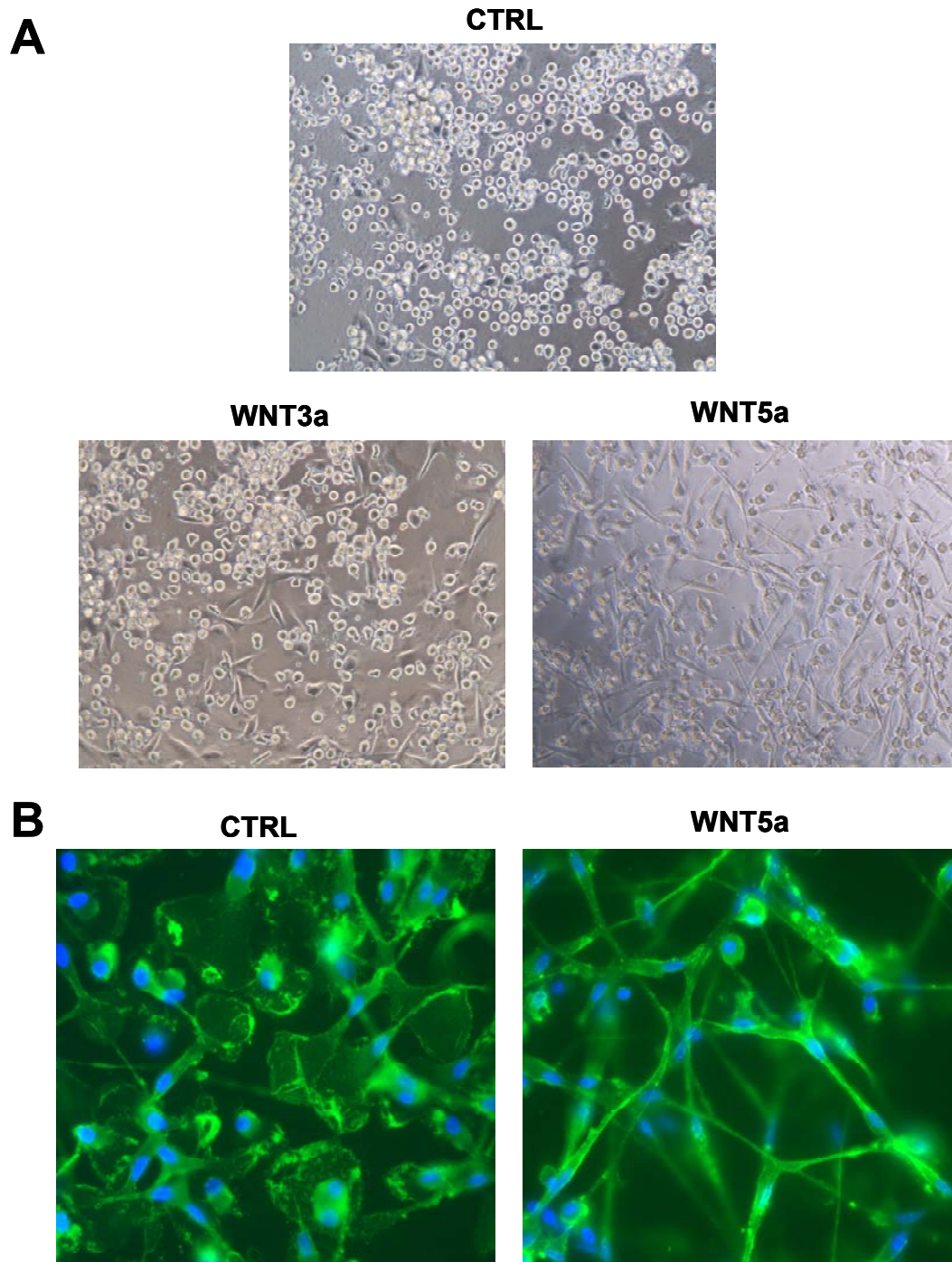


**Figura 4. Expresión de diferentes marcadores de membrana en las DCs.** Estudio por citometría de flujo en las células recuperadas tras 6 días de cultivo. (A) El porcentaje de células que expresa los distintos marcadores así como la intensidad media de fluorescencia (IMF) (en paréntesis) se muestran en cada histograma. Como controles negativos se usaron mAbs irrelevantes del mismo isotipo (histogramas en gris). Los datos son representativos de 4-9 experimentos independientes.

|            | WNT3a-DCs | WNT5a-DCs |
|------------|-----------|-----------|
| CD86       | 62±11*    | 51±17***  |
| CD83       | 113±38    | 125±43    |
| CD40       | 90±14     | 126±30    |
| CD80       | 93±12     | 138±20    |
| DC-SIGN    | 89±23     | 228±62*   |
| HLA-DR     | 75±15*    | 8 ±13*    |
| PD-L1      | 143±19*   | 259±43*   |
| PD-L2      | 127± 9    | 165±21*   |
| MMR        | 41±4**    | 63±17*    |
| E-Cadherin | 110±31    | 110±45    |

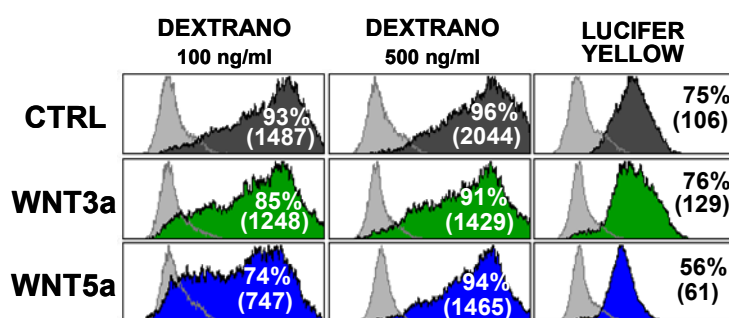
**Tabla 1. Expresión de diferentes marcadores de membrana en las DCs.** La tabla muestra los resultados de la IMF de la expresión de los diferentes marcadores en las Wnt-DCs respecto a los obtenidos en las CTRL-DCs. Los datos representan la media ± SD de 9 experimentos independientes, expresados como relativos al control (referido como 100%) \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$

Morfológicamente, no encontramos diferencias en el análisis de tamaño/complejidad realizado por citometría de flujo entre las Wnt-DCs y las CTRL-DCs (datos no mostrados). Sin embargo, la observación *in situ* de estas células nos mostró que mientras las DCs inmaduras diferenciadas en condiciones control son células redondeadas ricas en lamelipodios, en los cultivos donde se adicionaron proteínas Wnt las células presentaban morfología fusiforme con abundantes filopodios (Fig 5).



**Figura 5. Análisis morfológico de CTRL-, Wnt3a- y Wnt5a-DCs.** (A) Imágenes con microscópico invertido y (B) análisis mediante inmunofluorescencia de iDCs a los 6 días de cultivo diferenciadas en presencia o ausencia de Wnt3a o Wnt5a. (B) Las iDCs fueron marcadas con anticuerpos anti-HLA-DR (fluorescencia verde) y se uso Hoechst 33258 como marcador nuclear (fluorescencia azul). Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos diferentes. Nótese la forma redondeada de las células presentes en los cultivos control mientras que en los cultivos de iDCs diferenciadas en presencia de proteínas Wnt las células son alargadas y forman una red.

Una de las características más importantes de las DCs en su condición inmadura es su capacidad para captar antígenos. Con el propósito de estudiar el posible efecto de las proteínas Wnt en esta función de las DCs, llevamos a cabo estudios para valorar la endocitosis mediada por receptor y la capacidad de captación inespecífica por macropinocitosis constitutiva utilizando dextrano y *Lucifer Yellow*, respectivamente. Nuestros resultados mostraron que las DCs diferenciadas en presencia de proteínas Wnt eran menos eficientes en la endocitosis de dextrano. Este efecto estaría probablemente relacionado, en parte, con sus menores niveles de expresión de MMR, receptor de manosa involucrado en la captación de este tipo de moléculas, presentes, entre otros, en las glucoproteínas y glucolípidos de las paredes celulares microbianas (Mahnke y col. 2000). Asimismo, también encontramos una disminución en la macropinocitosis o endocitosis de fase fluida determinada mediante la captación de *Lucifer Yellow* (Fig. 6).



**Figura 6. Análisis por citometría de flujo de la capacidad para captar antígenos de las DCs diferenciadas en presencia o ausencia de proteínas Wnt.** Tras 6 días de cultivo, las DCs diferenciadas en ausencia o en presencia de *Wnt3a* o *Wnt5a* fueron incubadas con diferentes concentraciones de FITC-Dextrano (40KDa) (100 ng/ml o 500 ng/ml) o *Lucifer yellow* (1 mg/ml) a 37°C, y tras 45 minutos su internalización fue medida por citometría de flujo. Como controles negativos se incubaron DCs con los mismos tratamientos a 0° C (histogramas en gris). La IMF (en paréntesis) se muestra en cada histograma. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

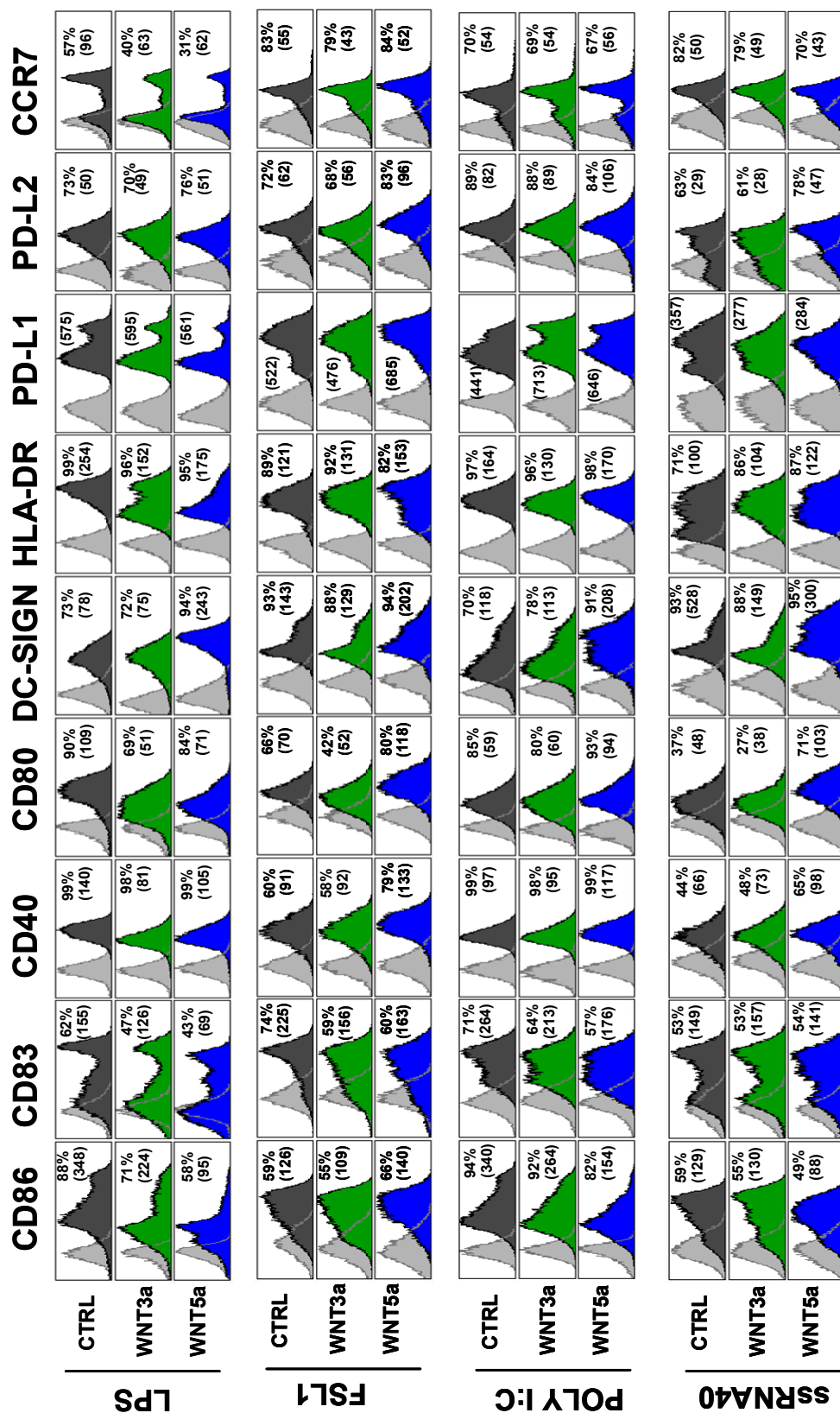
## 2.2 Las Wnt-DCs presentan alterada su capacidad para responder a estímulos TLR

A continuación analizamos la capacidad de las DCs que habían diferenciado en presencia de proteínas Wnt para responder a diferentes estímulos TLR. Esta etapa del cultivo se realizó en ausencia de proteínas Wnt exógenas, y así antes de añadir el estímulo, el medio de cultivo fue remplazado por medio fresco atemperado, sufriendo este mismo proceso los cultivos control. Nuestros resultados mostraron que, comparando con las CTRL-DCs, las Wnt-DCs responden de forma anómala a la estimulación vía TLR, en diferente grado dependiendo del estímulo, y de nuevo, en términos generales las Wnt5a-DCs estaban más afectadas que las Wnt3a-DCs.

La exposición de las DCs a ligandos TLR desencadena un proceso madurativo que se ve reflejado en su fenotipo. Por una parte las DCs disminuyen su capacidad de capturar antígenos por lo que reducen la expresión, entre otros receptores, de DC-SIGN, y por otra, incrementan los niveles en superficie de MHC-II y moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86, así como otros marcadores (CD83, PD-L1 y PD-L2). Además adquieren CCR7 lo que les permite migrar a los ganglios linfáticos (Fig.4 y 7) (*Palucka y Banchereau 2012*). En nuestros cultivos tratados con Wnt5a este proceso se veía profundamente alterado. Así las Wnt5a-DCs estimuladas con el lipopolisacárido bacteriano LPS, no incrementaban correctamente la expresión de CD83, HLA-DR, CD40, CD86, CD80 y CCR7. Sin embargo, sí aumentaban, como las CTRL-DCs, los niveles de PD-L1 y PD-L2, lo que podría favorecer un balance inhibitorio durante la interacción con las células T. Además los niveles de DC-SIGN de estas células se mantuvieron por encima de los de las CTRL-DCs (Fig. 7 y Tabla 2).

Obtuvimos un efecto similar en el fenotipo de las Wnt5a-DCs durante la maduración con otros ligandos TLR bacterianos, como Pam3CSK4, que señala a través de TLR2/1, y flagelina, ligando de TLR5 (datos no mostrados). Por otra parte, en respuesta a la lipoproteína sintética FSL1, que señala a través de TLR2/6, o a otros ligandos víricos como Poly I:C y ssRNA40, que señalizan a través de TLR3 y TLR8, respectivamente, los efectos que se observaron fueron menos notables ((Fig. 7 y Tabla 2). Así, mientras las Wnt5a-DCs estimuladas con los ligandos víricos no incrementaban la expresión de CD86 como lo hacían sus respectivos cultivos control, los niveles de esta molécula coestimuladora eran normales en las Wnt5a-DCs estimuladas con FSL1. Sin embargo, los niveles de CD40 y CD80 en estas células tras la estimulación con los tres ligandos eran similares a los obtenidos en las CTRL-DCs. Por otra parte, en todos los casos la expresión de los ligandos inhibidores PD-L1 o PD-L2 en las Wnt5a-DCs era mayor que en sus respectivas células control (Fig. 7 y Tabla 2).

Los efectos observados en el fenotipo de las Wnt3a-DCs fueron menos notables, aunque en todos los casos, excepto tras la estimulación con ssRNA40, observábamos una menor expresión de CD86 y CD83 respecto a los cultivos control. No obstante, la mayor parte de los marcadores estudiados en estas células no presentaban grandes cambios en sus niveles de expresión respecto a las CTRL-DCs (Fig. 7 y Tabla 2)



**Figura 7. Análisis fenotípico de las DCs estimuladas con ligandos TLR.** Las Wnt-DCs fueron estimuladas durante 24 horas con diferentes agonistas de receptores TLR (LPS, FSL1, Poly I:C y ssRNA40). Para evitar la influencia de las proteínas Wnt durante el proceso de estimulación, previamente se retiró el medio de cultivo y se incorporó medio fresco donde se añadieron los ligandos TLR. Los histogramas muestran la expresión de diferentes moléculas de membrana analizadas por citometría de flujo tras 24 horas de estimulación vía TLR. En cada histograma se muestra el porcentaje de células positivas, determinado de acuerdo al marcaje del control negativo (histogramas en gris), y la IMF (en paréntesis). Los datos mostrados son representativos de 5 experimentos diferentes.

|         | LPS       |           | FSL1      |           | POLY I:C  |           | ssRNA40   |           |
|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|         | WNT3a-DCs | WNT5a-DCs | WNT3a-DCs | WNT5a-DCs | WNT3a-DCs | WNT5a-DCs | WNT3a-DCs | WNT5a-DCs |
| CD86    | 64± 6*    | 35±20 **  | 115±41    | 105±29    | 77±10*    | 62±20*    | 97±6      | 65±12*    |
| CD83    | 82±19     | 50±15***  | 66±4*     | 65±19*    | 96±23     | 63±23*    | 89±20     | 97±8      |
| CD40    | 68±5*     | 60±18     | 100±10    | 146±56    | 99±19     | 119±11    | 101±23    | 129±22    |
| CD80    | 56±8*     | 52±18*    | 72±12*    | 142±48    | 97±7      | 153±38    | 84±11     | 145±59    |
| DC-SIGN | 104±12    | 246±90*   | 75 ± 32   | 128±26    | 90±19     | 164±33*   | 70±27     | 149±38*   |
| HLA-DR  | 75±20*    | 63±24*    | 110±12    | 104±34    | 80±15*    | 112±34    | 109±26    | 99±34     |
| PDL1    | 123±31    | 90±28     | 88±4      | 126±12*   | 153±20    | 152±17*   | 85±11     | 93±28     |
| PDL2    | 99±22     | 89 ± 20   | 90±8      | 149±7*    | 103±9     | 130±8*    | 103±23    | 159±27*   |
| CCR7    | 68±3**    | 70 ± 9*   | 97±23     | 98±10     | 101±7     | 82±29     | 98±43     | 92±14     |

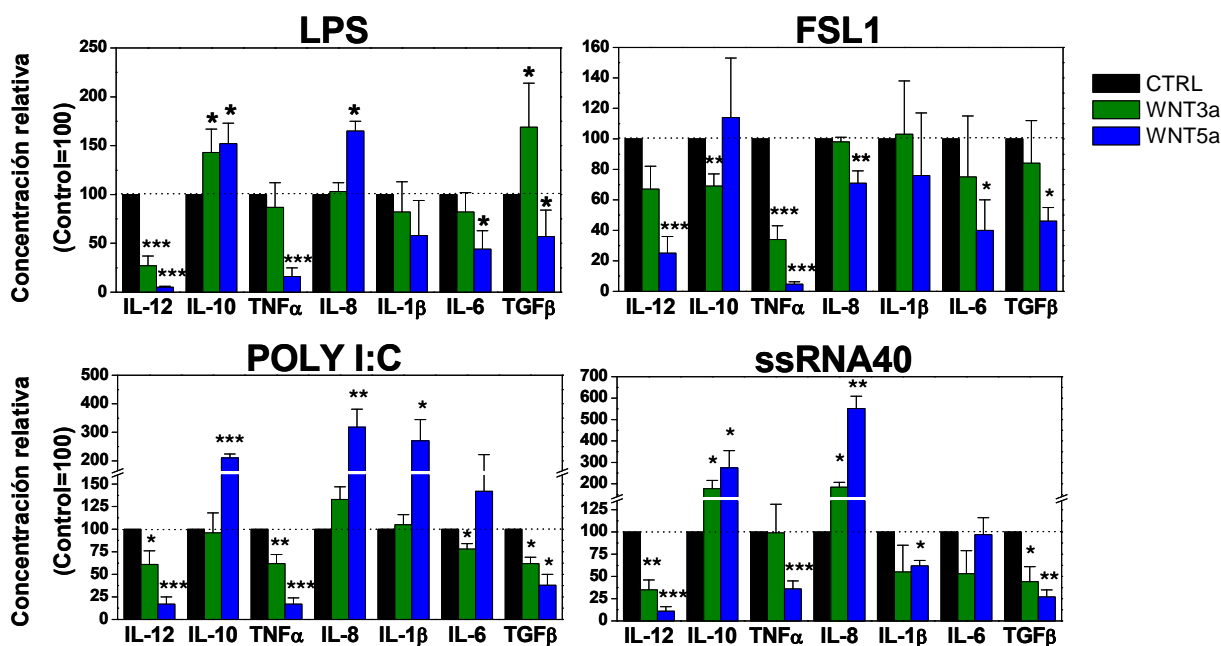
**Tabla 2. Cambios fenotípicos en las Wnt-DCs tras estimulación vía TLR.** La tabla muestra la IMF de la expresión de los diferentes marcadores en las Wnt-DCs tras estimulación durante 24 horas con diferentes ligandos TLR (LPS, FSL1, Poly I:C y ssRNA40) respecto a los obtenidos en las CTRL-DCs. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes, expresados como relativos al control (referido como 100%) \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$

En respuesta a un estímulo madurativo las DCs producen diferentes citocinas que juegan un papel muy importante en la polarización de los linfocitos T (Reid y col. 2000). Por ello a continuación analizamos la capacidad de las Wnt-DCs para secretar diversas citocinas en respuesta a distintos estímulos TLR (TLR-Wnt-DCs).

Como se observa en la Figura 8, las Wnt-DCs producen niveles significativamente menores de las dos citocinas típicamente pro-Th1, IL-12 y TNF $\alpha$ , en comparación con las DCs diferenciadas en condiciones control. La reducción en los niveles de IL-12 en los cultivos de Wnt5a-DCs llegó a ser de hasta un 95% en el caso de la estimulación con LPS. En contraste, la secreción de IL-10 por parte de estas células se vio incrementada significativamente en todos los casos excepto tras el estímulo con FSL1, llegando a multiplicarse por dos tras el estímulo con Poly I:C (Fig.8). De acuerdo con esto, el ratio IL-10/IL-12 incrementó en todos los casos, lo que podría reducir la capacidad de las Wnt-DCs para polarizar a los linfocitos T *naive* hacia Th1.

Asimismo, encontramos diferencias en la capacidad de las Wnt-DCs para secretar otras citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$  e IL-8. Los efectos que observábamos en nuestros cultivos dependían tanto del estímulo TLR con el que hubieran sido activadas las DCs como del ligando Wnt en presencia del cual hubieran diferenciado. Así, mientras que todas las TLR-Wnt5a-DCs estudiadas producían menor cantidad de TGF $\beta$  respecto a las TLR-CTRL-DCs, sólo obtuvimos niveles significativamente menores de IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos de Wnt5a-DCs respecto a los cultivos control en el caso de la estimulación de estas con LPS y FSL1 (Fig. 8). Sin embargo, los efectos sobre la producción de IL-8 e IL-1 $\beta$  fueron más dispares. En general, las Wnt5a-DCs producen más cantidad de IL-8 que las CTRL-DCs excepto tras el estímulo con

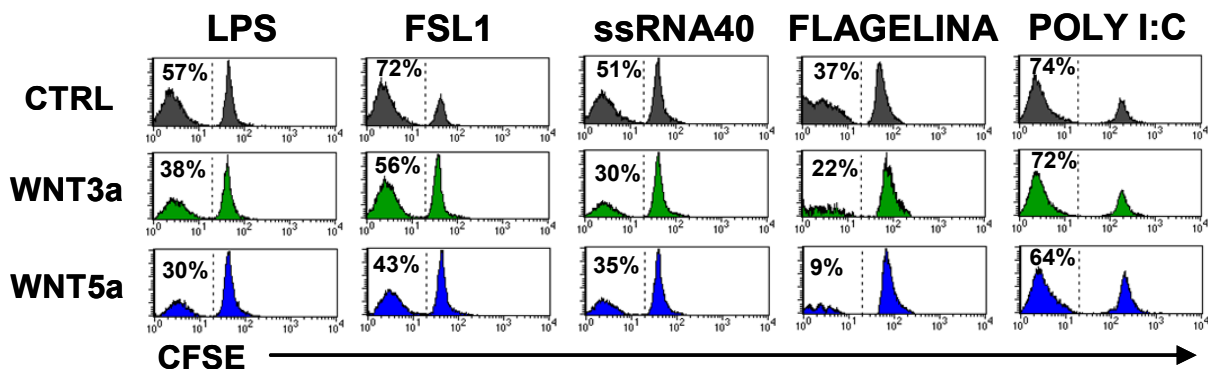
FSL1, llegando a multiplicarse por seis los niveles de esta citocinas en los cultivos de Wnt5a-DCs estimuladas con ssRNA40. Por otra parte, las diferencias en los niveles de IL-1 $\beta$  sólo fueron significativas en los cultivos de Wnt5a-DCs estimuladas con ligandos víricos, aunque de nuevo encontramos diferencias entre ambos estímulos. Mientras que las Wnt5a-DCs estimuladas con ssRNA40 producen menos IL-1 $\beta$  que las CTRL-DCs, los niveles de esta citocina encontrados en los cultivos de Wnt5a-DCs estimuladas con Poly I:C triplicaban los niveles encontrados en condiciones control (Fig. 8).



**Figura 8. Producción de citocinas por las Wnt-DCs en respuesta a ligandos TLR.** Las DCs que habían diferenciado en presencia o ausencia de proteínas Wnt fueron estimuladas con diferentes ligandos de receptores TLR (LPS, FSL1, Poly I:C y ssRNA40). Tras 48 horas, los sobrenadantes de los distintos cultivos fueron recogidos, midiéndose en ellos la concentración de IL-12p70, IL-10, TNF $\alpha$ , IL-8 por ELISA e IL-1 $\beta$ , IL-6 y TGF $\beta$  mediante ensayos CBA. Nótese el corte en el eje Y, así como el cambio de escala a partir del mismo en algunas gráficas. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 5 a 9 experimentos independientes, expresados como relativos a cada control individual (barras negras, referidas como 100%) \* p $\leq$ 0.05; \*\* p $\leq$ 0.005; \*\*\* p $\leq$ 0.0005.

### 2.3 Las Wnt5a-DCs tienen menor capacidad aloestimuladora y promueven la secreción de IL-10 por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive

Como hemos mostrado hasta el momento, las Wnt-DCs tenían un fenotipo alterado y su capacidad para producir citocinas tras estimulación con diferentes ligandos TLR estaba afectada. Esto nos sugirió que su función como célula presentadora de antígenos podría haberse modificado también. Para analizar esta posibilidad llevamos a cabo ensayos de MLR utilizando DCs, diferenciadas en presencia o ausencia de proteínas Wnt, activadas con distintos ligandos TLR para estimular linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive alotéricos. Mediante el método de dilución de CFSE estudiamos la respuesta proliferativa de los linfocitos T inducida por las DCs. Para ello los linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive fueron marcados con CFSE, lo que nos permitió analizar, tras 7 días de cultivo, el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup> y por tanto valorar los niveles de proliferación. Como se observa en la Figura 9, en términos generales las Wnt-DCs inducían una respuesta proliferativa significativamente menor a la inducida por las CTRL-DCs, llegando a obtenerse una reducción de más del 70% en el porcentaje de linfocitos T que habían proliferado en respuesta a las Wnt5a-DCs estimuladas con flagelina (Fig. 9). Curiosamente, aunque las Wnt5a-DCs estimuladas con Poly I:C tenían un fenotipo alterado y su capacidad para producir citocinas también estaba profundamente afectada (Fig. 7 y 8), no obtuvimos un efecto significativo en la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4 naive estimulados con estas (Fig. 9).

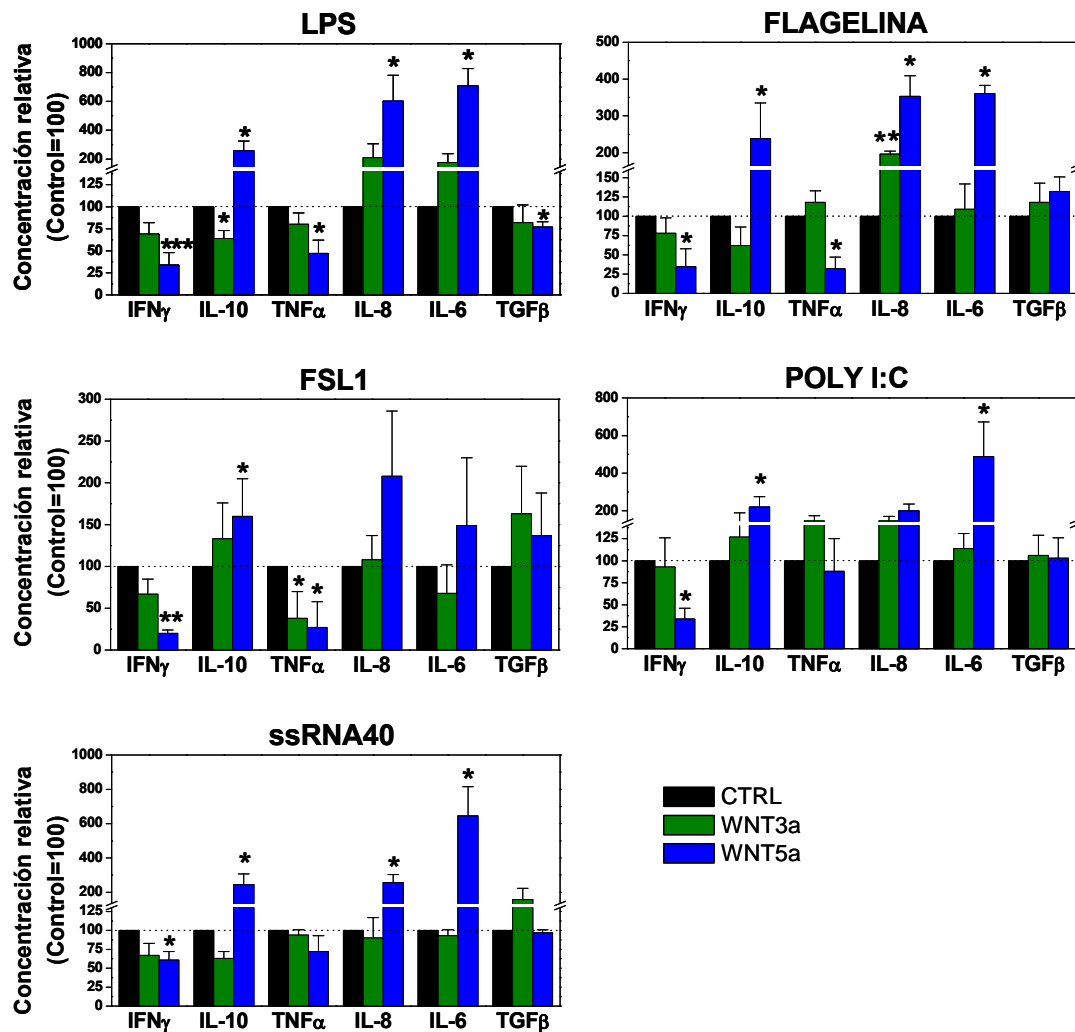


**Figura 9.** Análisis de la respuesta proliferativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive estimulados con Wnt-DCs maduras. Wnt-DCs, estimuladas con diferentes ligandos TLR, fueron cultivadas en MLR con linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive (marcados con CFSE) en un ratio 1:10 DC/célula T. Tras siete días de cultivo las células fueron marcadas con anti-CD3. Los histogramas muestran el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> con más de 1 ciclo de división. Usamos células T cultivadas en ausencia de DCs como control negativo. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Por otra parte, analizamos la capacidad de estas DCs para polarizar la respuesta de los linfocitos T CD4 *naive*, determinando los niveles de ciertas citocinas en los sobrenadantes de los MLR tras 7 días de cultivo. Observamos que las CTRL-DCs eran capaces de polarizar eficientemente hacia una respuesta Th1, puesto que inducían la producción de niveles importantes de IFN $\gamma$  por parte de los linfocitos T (2-7 ng/ml) mientras que fallaban en la inducción de una respuesta Th2 o Th17, puesto que los niveles de IL-4 e IL-17A detectados en los sobrenadantes fueron muy bajos (3-10 pg/ml) e indetectables (<2,5 pg/ml), respectivamente. Los linfocitos T primados con TLR-Wnt5a-DCs producían menor cantidad de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , siendo esta reducción más importante en los MLR establecidos con Wnt5a-DCs estimuladas con ligandos bacterinos, LPS y FSL1. Encontramos los niveles más bajos de estas citocinas en los sobrenadantes de los cultivos establecidos con FSL1-Wnt5a-DCs, llegando a reducirse hasta un 80 y un 70% los niveles de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  respectivamente, en relación a los cultivos control (Fig. 10).

Sin embargo, los linfocitos T primados con TLR-Wnt5a-DCs producían mayor cantidad de IL-10, multiplicándose por dos, en todos los casos, los niveles de esta citocina en los sobrenadantes de los MLR establecidos con Wnt5a-DCs respecto a los cultivos en condiciones control (Fig. 10). Por lo tanto, parece que las Wnt5a-DC estarían regulando negativamente la polarización de los linfocitos T CD4 *naive* hacia una respuesta Th1 reduciendo los niveles de IFN $\gamma$  e induciendo, en cambio, una mayor producción de IL-10.

Por otra parte encontramos diferencias en la producción de IL-8 e IL-6 respecto a los cultivos control. En los sobrenadantes de los MLR establecidos con TLR-Wnt5a-DCs detectamos mayores niveles de ambas citocinas, llegando a multiplicarse por 6 y por 7 los niveles de IL-8 e IL-6, respectivamente, en los cultivos establecidos con LPS-Wnt5a-DCs respecto a los cultivos control. Sin embargo, no encontramos diferencias en la producción de IL-4 e IL-17A (datos no mostrados) y sólo en los MLR establecidos con LPS-Wnt5a-DCs los niveles de TGF $\beta$  eran menores que en los establecidos con LPS-CTRL-DCs (Fig. 10).

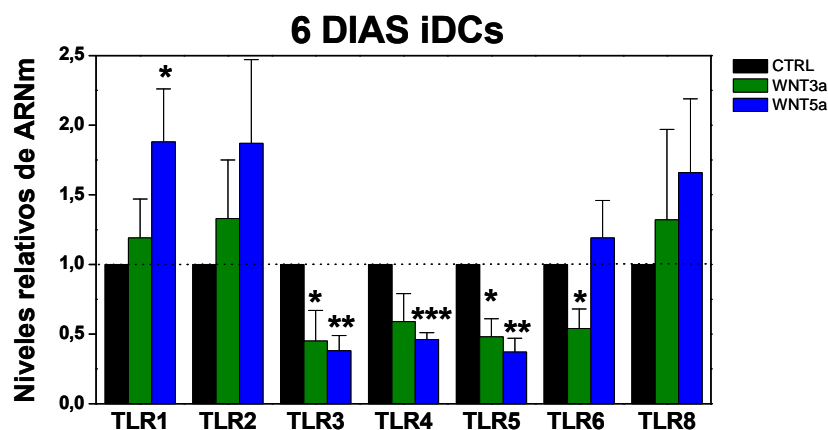


**Figura 10.** Análisis de los niveles de citocinas en los sobrenadantes de MLR establecidos con TLR-Wnt-DCs y linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive alogénicos. TLR-Wnt-DCs fueron cultivadas en MLR para estimular linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive. Tras 7 días de cocultivo los sobrenadantes fueron recogidos y la cantidad de IFN $\gamma$ , IL-10, TNF $\alpha$ , IL-8, IL-6 y TGF $\beta$  fue analizada. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 6 a 9 experimentos independientes, expresados como relativos a cada control individual (barras negras, referidas como 100%) \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$

Respecto a las Wnt3a-DCs, aunque detectamos una menor capacidad para inducir una respuesta proliferativa que las CTRL-DCs (Fig. 9), en general, los niveles de citocinas obtenidos en los sobrenadantes de los MLR establecidos con estas células, no fueron significativamente diferentes a los encontrados en los cultivos control. Cabe destacar, que al igual que en el caso de las Wnt5a-DCs, detectamos una reducción significativa en los niveles de TNF $\alpha$  en los MLR establecidos con FSL1-Wnt3a-DCs y un incremento en los niveles de IL-8 en aquellos establecidos con Flagelina-Wnt3a-DCs. Sin embargo, al contrario de lo observado con las LPS-Wnt5a-DCs, los niveles de IL-10 detectados en los sobrenadantes de los MLR establecidos con LPS-Wnt3a-DCs eran menores que en los cultivos control (Fig. 10).

## 2.4 El perfil transcripcional de las Wnt5a-DCs se correlaciona con sus alteraciones funcionales

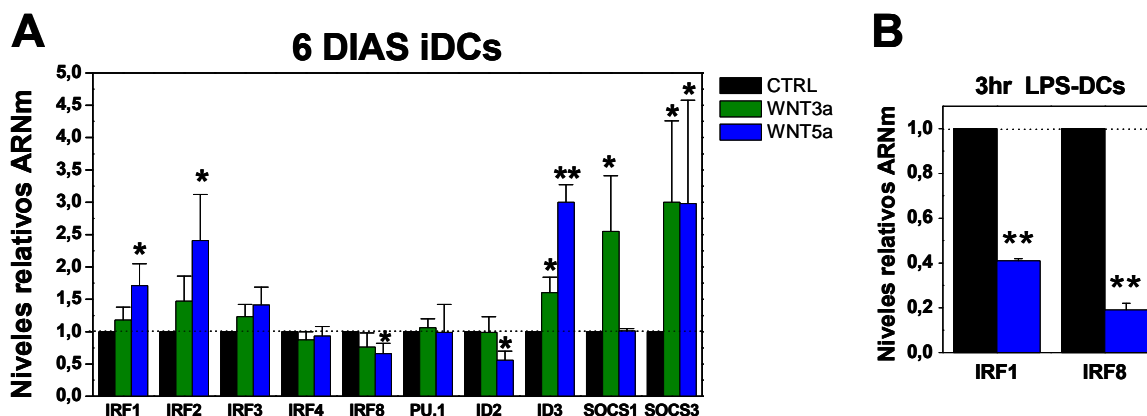
Puesto que una disminución en la expresión de los receptores TLR podría explicar, al menos en parte, la respuesta anómala de las Wnt-DCs a los diferentes estímulos TLR, llevamos a cabo un análisis comparativo por PCRq de los niveles de transcrito de los diferentes TLR en las Wnt-DCs respecto a las CTRL-DCs en su condición inmadura, tras 6 días de cultivo. Como se observa en la Figura 11, las Wnt-DCs presentaban niveles de transcrito de TLR3, TLR4, y TLR5 significativamente menores que las CTRL-DCs, lo que estaría de acuerdo con la inadecuada respuesta que observamos a Poly I:C, LPS y Flagelina, respectivamente. Sin embargo, aunque la respuesta a Pam3CSK4, FSL1 y ssRNA40 en las Wnt5a-DCs también se vio afectada, no encontramos en estas células cambios estadísticamente significativos en los niveles de transcrito de TLR2, TLR6 y TLR8, e incluso observamos un incremento en los niveles de TLR1. Curiosamente las Wnt3a-DCs presentaban niveles menores de TLR6 aunque su respuesta a FSL1 estaba menos afectada que la de las Wnt5a-DCs (Fig. 11). Por otra parte, al igual que lo observado para las Wnt5a-DCs, las Wnt3a-DCs expresaban niveles menores de TLR3 y TLR5 que las CTRL-DCs (Fig. 11)..



**Figura 11. Análisis por PCR cuantitativa de la expresión de receptores TLR en las Wnt-DCs inmaduras a los 6 días de cultivo.** El diagrama de barras muestra la expresión relativa de ARNm de cada receptor en las Wnt-DCs respecto a la expresión en las CTRL-DCs. En cada caso la expresión del receptor en las células control es 1. La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de GAPDH que fue utilizando como control endógeno. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 5 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$

A continuación seguimos estudiando otros mecanismos, además de la expresión de TLRs, que pudieran estar determinando las características funcionales de las Wnt-DCs. Para ello analizamos los niveles de ARNm de diferentes factores de transcripción y proteínas reguladoras implicadas en la maduración y función de las DCs (Fig. 12).

Mostramos especial interés por IRF1 e IRF8 puesto que son factores de transcripción esenciales para la expresión de IL-12 (Wang y col. 2000; Liu y col. 2004), cuya producción estaba seriamente afectada en las Wnt-DCs. El estudio por PCR cuantitativa mostró que antes de ser estimuladas, las Wnt5a-DCs expresaban niveles menores de IRF8, aproximadamente un 60% de los valores observados en las CTRL-DCs, mientras que los niveles de IRF1 en estas células estaban incrementados (Fig. 12A). Cuando analizamos los niveles de transcripción de estos genes en las DCs tras 3 horas de estimulación con LPS, encontramos que en las CTRL-DCs los valores de IRF1 e IRF8 se multiplicaban entre 6 y 14 veces (datos no mostrados), lo que era coherente con la inducción de la expresión de IL-12 que acontece como consecuencia de la maduración de las DCs. En contraste, tras el estímulo con LPS en las Wnt5a-DCs no observamos esta inducción de IRF1 e IRF8, cuyos niveles, por tanto, quedaban muy por debajo de los observados en las CTRL-DCs (Fig 12B).

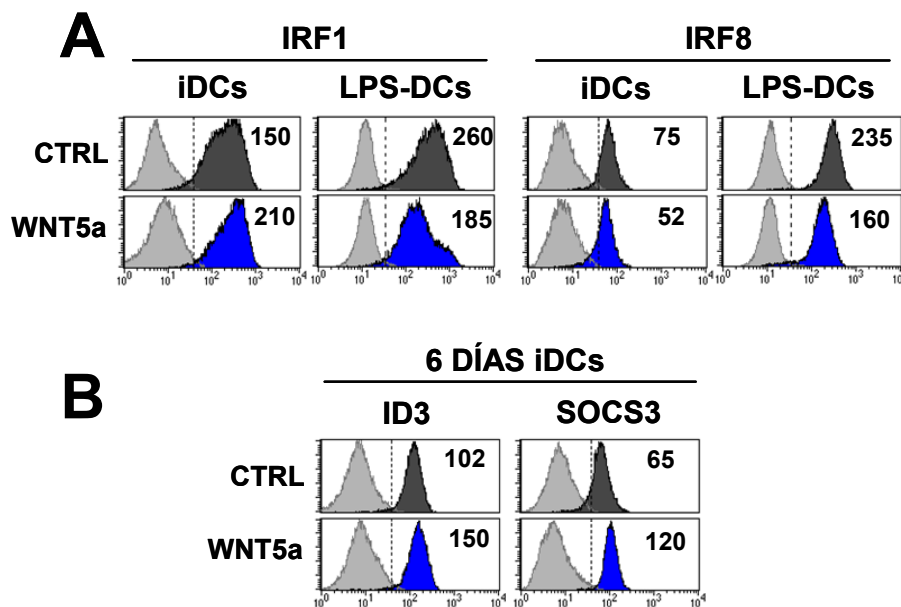


**Figura 12. Estudio a nivel de ARNm de la expresión de factores de transcripción y proteínas reguladoras implicadas en el desarrollo, diferenciación y función de las DCs.** (A) Cuantificación por PCR a tiempo real de los niveles de ARNm de diferentes factores de transcripción y proteínas reguladoras en DCs diferenciadas en presencia de proteínas Wnt respecto a los niveles en DCs control. (B) Control (barra negra) y Wnt5a-DCs (barra azul) fueron estimuladas durante 3 horas con LPS y los niveles de transcrito de IRF1 e IRF8 fueron analizados por PCR cuantitativa. En cada caso la expresión en las células control es 1. La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de GAPDH que fue utilizado como control endógeno. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 5 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$

Una vez conocido el efecto a nivel transcripcional, quisimos conocer si esto se traducía en cambios a nivel de proteína. Como se observa en la Figura 13A, en las CTRL-DCs la expresión intracelular de IRF1 e IRF8 se incrementa tras su estímulo con LPS, mientras que en las Wnt5a-DCs aunque los niveles de expresión de IRF8 se incrementan, lo hacen notablemente menos que en las CTRL-DCs. En el caso de IRF1 su expresión en las Wnt5a-DCs incluso disminuye tras la estimulación (Fig. 13A). Por lo tanto, los efectos observados en estos genes a

nivel transcripcional se traducían en cambios a nivel de proteína. Estos resultados podrían explicar, al menos parcialmente, la menor producción de IL-12 por parte de estas células.

Otra de las modificaciones funcionales que encontrábamos en las Wnt5a-DCs era la mayor producción de IL-10. Se ha descrito que en monocitos y moDCs la sobreexpresión de ID3 se asocia a un incremento en la producción de IL-10 y que la respuesta a IL-10 a su vez induce la expresión de ID3, estableciéndose un lazo de retroalimentación positiva (Kuo y col. 2011). En este sentido encontramos un importante incremento en los niveles de ID3 en las Wnt5a-DCs respecto a los de las CTRL-DCs y este efecto se observaba tanto a nivel de transcrito (Fig. 12A) como a nivel de proteína (Fig. 13B).



**Figura 13. Estudio a nivel de proteína de la expresión de factores de transcripción y proteínas reguladoras implicadas en el desarrollo, diferenciación y función de las iDCs.** A y B) La expresión intracelular de IRF1, IRF8, ID3 y SOCS3 analizada por citometría de flujo en CTRL- y Wnt5a-DCs tras 6 días de cultivo o tras 20 horas de estímulo con LPS. La IMF total se muestra en cada histograma. Como controles negativos se usaron mAbs irrelevantes del mismo isotipo (histogramas en gris). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

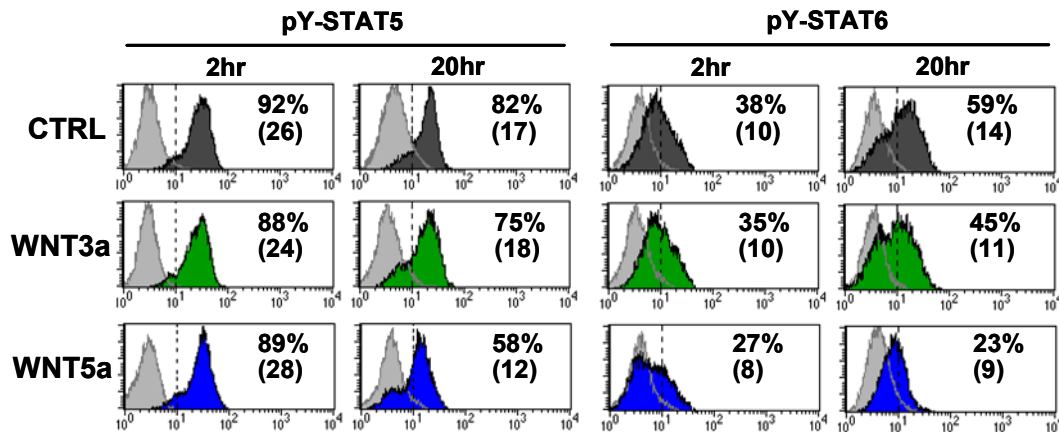
Las proteínas SOCS son también importantes moduladores de la activación de las DCs ya que regulan negativamente tanto la señalización a través de TLR como la transducción de señales iniciadas por citocinas y mediada por el complejo de proteínas Jak-Stat (Dimitriou y col. 2008). Nuestros resultados muestran que las Wnt5a-DCs expresaban niveles normales de transcrito para SOCS1 mientras que los de SOCS3 eran tres veces mayores que en las CTRL-DCs (Fig. 12A). De nuevo los resultados que obtuvimos mediante citometría de flujo confirmaban el efecto a nivel de proteína. (Fig. 13B).

También encontramos una reducción en la expresión de ID2 en las Wnt5a-DCs respecto a las CTRL-DCs, característica que se ha descrito en DCs tolerogénicas (*Torres-Aguilar y col. 2010*), mientras que la expresión de IRF2 en estas células era mayor que en las CTRL-DCs (Fig. 12A).

Respecto a las Wnt3a-DCs cabe destacar que expresaban mayores niveles de ID3 y SOCS3 que las CTRL-DCs, al igual que las Wnt5a-DCs, mientras que a diferencia de estas últimas las Wnt3a-DCs multiplicaban la expresión de SOCS1 hasta por un factor de tres (Fig. 12A).

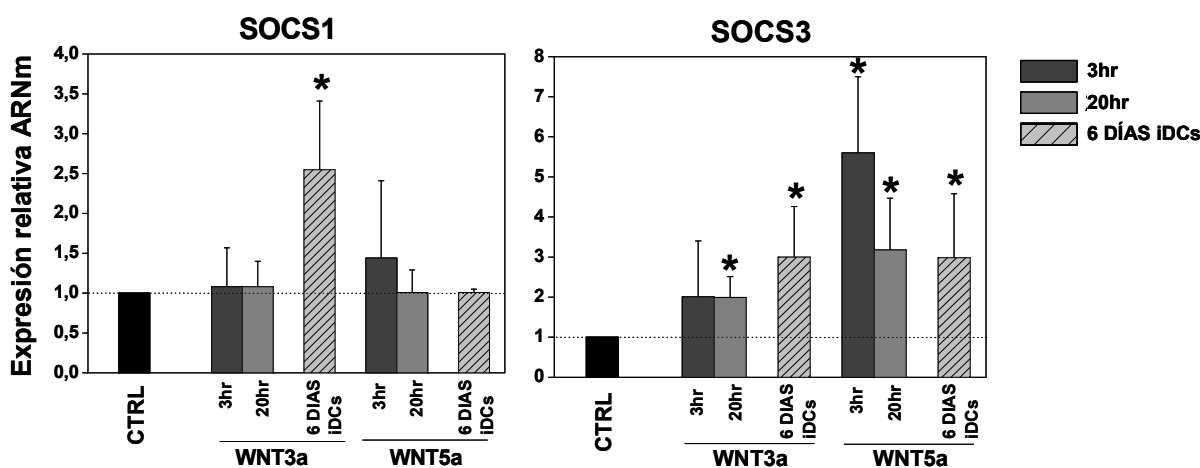
## **2.5 Wnt5a interfiere en la señalización GM-CSF/IL-4 necesaria para la diferenciación de monocitos en DCs**

A continuación, quisimos saber en qué aspectos moleculares del proceso de diferenciación de los monocitos a DCs había interferido Wnt5a. Puesto que el resultado de la diferenciación *in vitro* de los monocitos hacia DCs depende en última instancia de lo eficiente que sea la señalización GM-CSF/IL-4 (*Conti y Gessani 2008; Zhan y col. 2012*), analizamos los niveles de fosforilación de STAT5 y STAT6. Estas proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción son activadas (fosforiladas) por la señalización GM-CSF e IL-4 respectivamente (*Maier y col. 2012; van de Laar y col. 2012*). El análisis por citometría de flujo de monocitos cultivados con GM-CSF e IL-4 en presencia de Wnt3a o Wnt5a mostró una inhibición, significativa pero parcial, en la fosforilación de STAT5 y STAT6. Este efecto se hacía patente entre las 2 y 20 primeras horas de cultivo lo que nos sugería que la reducción en la respuesta a GM-CSF e IL-4 era un efecto secundario a la señalización Wnt en estas células (Fig. 14). De nuevo el efecto observado en respuesta a Wnt5a era muy superior al de Wnt3a. Cabe destacar que el tratamiento con Wnt5a redujo en más de un 60%, respecto a los cultivos control, el porcentaje de monocitos que tras 20 horas de cultivo con GM-CSF e IL-4 expresaban STAT6 fosforilada (Fig. 14).



**Figura 14. Niveles de fosforilación de STAT5 y STAT6 durante la fase temprana de diferenciación de los monocitos en DCs.** Monocitos humanos fueron cultivados con GM-CSF/IL-4 en presencia o ausencia de Wnt3a o Wnt5a. Los niveles intracelulares de STAT5 y STAT6 fosforiladas en Tyr<sup>694</sup> y Tyr<sup>641</sup> respectivamente, se analizaron tras 2 y 20 horas de cultivo por citometría de flujo. El porcentaje de células positivas, determinado de acuerdo al control negativo (histograma en gris), y la IMF total (en paréntesis) se muestra en cada histograma. Los datos mostrados con representativos de 4 experimentos independientes.

Puesto que las proteínas SOCS pueden interferir en la activación de las STAT, mediante la inhibición de la activación de proteínas JAK, (Croker y col. 2008) a continuación analizamos los niveles de expresión de SOCS1 y SOCS3, dos miembros de la familia de proteínas SOCS. La expresión de estos genes es baja durante las primeras etapas de la diferenciación de las DCs pero se va incrementando durante el proceso de diferenciación (Dimitriou y col. 2008), y su sobreexpresión en precursores de DCs se ha asociado con un bloqueo en la diferenciación de las mismas (Bartz y col. 2006). En este sentido, como se observa en la Figura 15, durante las primeras horas de cultivo de los monocitos con GM-CSF e IL-4, el tratamiento con proteínas Wnt inducía un incremento en la expresión de SOCS3 pero no de SOCS1 respecto a los cultivos control. Así detectamos que el tratamiento con Wnt5a promovía un rápido y fuerte incremento en los niveles de SOCS3 y a las 3 horas de cultivo los niveles de transcrito de esta proteína eran 6 veces mayores en estas células que en los cultivos control (Fig. 15). Sin embargo, aunque el tratamiento con Wnt3a también inducía un incremento en la transcripción de SOCS3, éste no se detecta de manera estadísticamente significativa hasta pasadas 20 horas de cultivo. Asimismo, es importante destacar, que los niveles de transcrito de esta proteína se mantenían elevados en las Wnt-DCs a los 6 días de cultivo (Fig.15 y Fig. 12A). Curiosamente era en este momento, y sólo tras el tratamiento con Wnt3a, cuando detectábamos un incremento significativo en los niveles de SOCS1 (Fig. 15).



**Figura 15. Análisis de la expresión de SOCS1 y SOCS3 por PCR cuantitativa durante el proceso de diferenciación de las DCs.** Los niveles de ARNm de SOCS1 y SOCS3 fueron determinados por PCR a tiempo real durante el proceso de diferenciación de los monocitos en DCs, tras 3 y 20 horas y 6 días de cultivo. Los resultados mostrados se expresan respecto a la expresión en cada control individual siendo ésta igual a 1. La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión del control endógeno GAPDH. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 5 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$ .

Por lo tanto, el incremento observado en las proteínas SOCS tras el tratamiento con los ligandos Wnt podría explicar, al menos en parte, la inhibición parcial en la fosforilación de las proteínas STAT que se producía en las Wnt-DCs (Fig. 14).

## 2.6 Wnt5a modifica el programa genético de los monocitos durante las primeras etapas de su diferenciación en DCs

Durante las primeras horas de cultivo, la señalización GM-CSF/IL-4 desencadena un programa genético que permite el desarrollo de las DCs induciendo importantes cambios en la expresión de diversos factores de transcripción y proteínas reguladoras necesarias para su diferenciación y posterior función (Gabriele y Ozato 2007; Belz y Nutt 2012). Puesto que habíamos observado que la señalización Wnt interfería con la señalización de estas citocinas, analizamos si esto se veía reflejado en los cambios transcripcionales que se desencadenan durante las primeras 20 horas de cultivo.

Se ha descrito un papel crucial de algunos miembros de la familia IRF en la diferenciación y activación de las DCs (Gabriele y Ozato 2007) por lo que analizamos la cinética de la expresión de 5 de sus miembros. Como se observa en la Figura 16, en los cultivos control las cinéticas de expresión de IRF2, IRF3 e IRF4 eran similares. En los tres casos sus niveles de expresión eran muy bajos en los monocitos y aumentaban notablemente durante las primeras horas de su diferenciación en DCs. De hecho, de entre todos los genes estudiados, fue

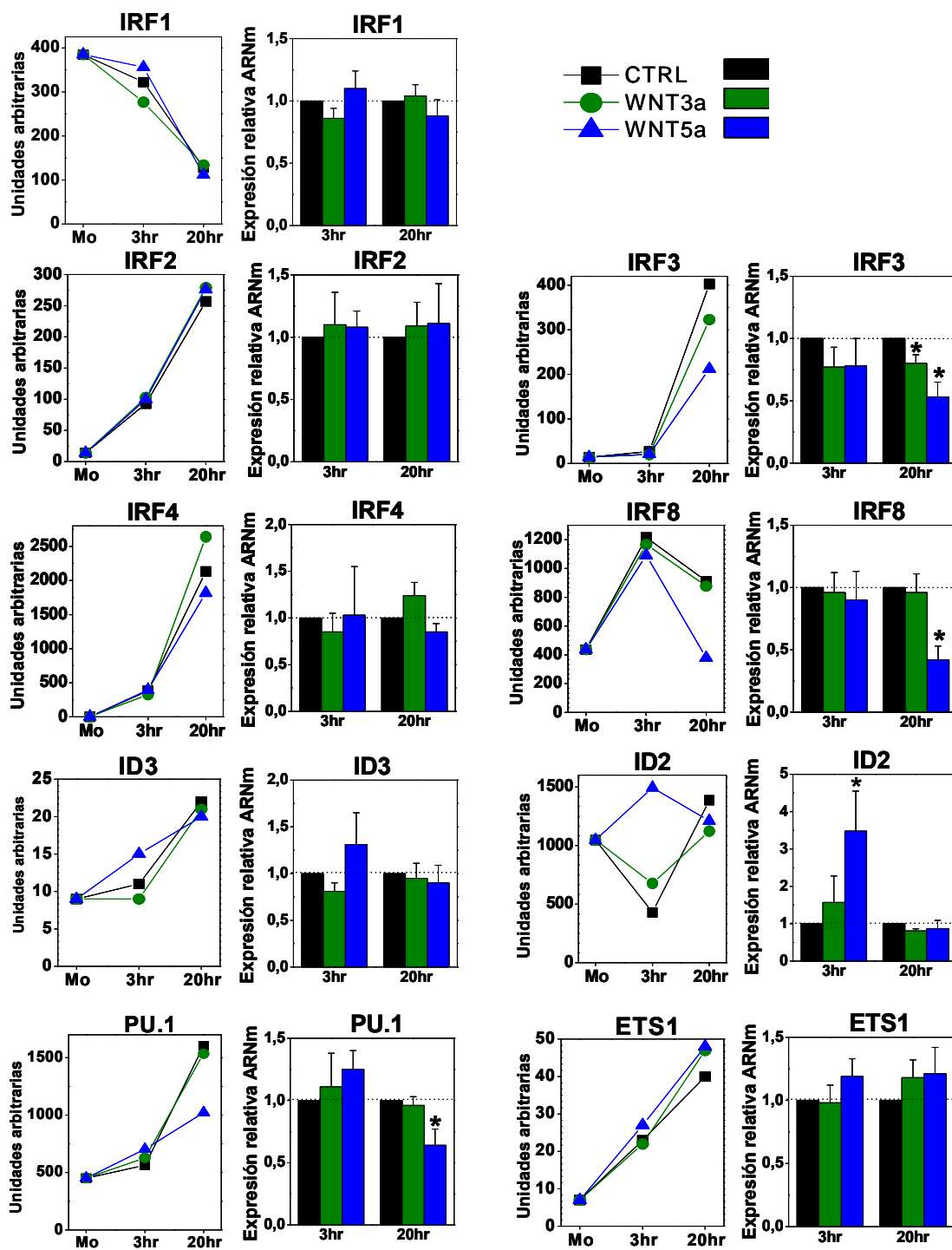


Figura 16. Análisis por PCR cuantitativa del efecto de las proteínas Wnt durante la fase temprana de diferenciación de los monocitos en DCs. Monocitos humanos fueron cultivados, en presencia o ausencia de proteínas Wnt, con GM-CSF/IL-4 promoviendo su diferenciación hacia DCs. Se analizaron por PCR cuantitativa los niveles de expresión de diferentes factores de transcripción y proteínas reguladoras en los monocitos (Mo) y tras 3 o 20 horas de cultivo. Las gráficas de líneas representan la cinética de expresión en los cultivos control (cuadrados negros), Wnt3a (círculo verde) y Wnt5a (triángulo azul); los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Las gráficas de barras muestran los niveles de expresión relativos a cada control individual (barras negras referidas como 1). La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de GAPDH que fue utilizado como control endógeno. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$ .

IRF4 el que alcanzó los niveles de expresión más altos a las 20 horas de cultivo (Fig. 16). En cuanto a IRF8 también sufría un incremento importante pero sólo durante las 3 primeras horas de cultivo. En contraste, la cinética de IRF1 en los controles era totalmente diferente, su expresión en monocitos era elevada, y se reducía rápidamente en las primeras horas de la diferenciación a DCs (Fig. 16).

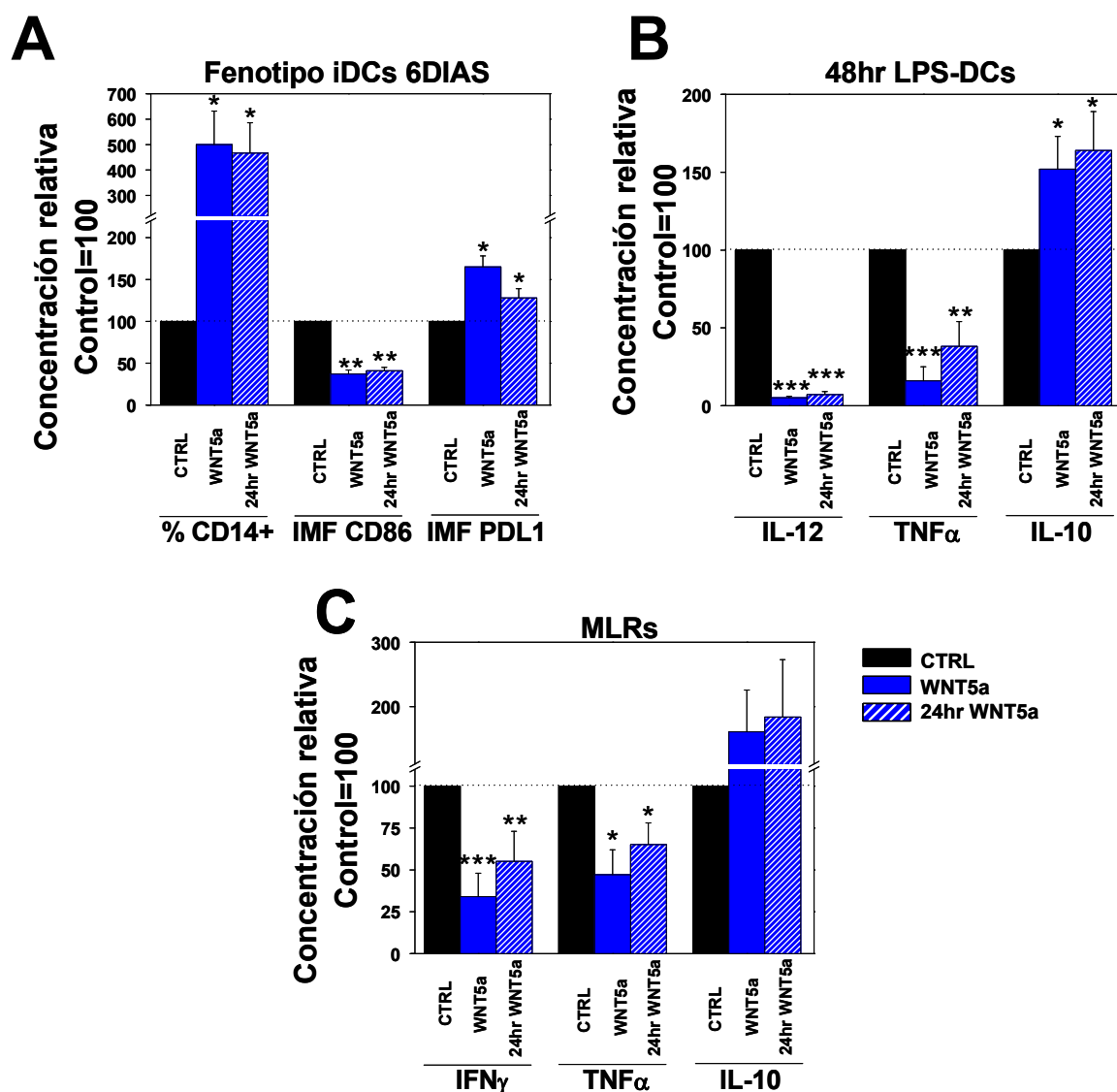
Por otra parte, PU.1 y ETS1, dos factores de transcripción de la familia ETS implicados también en el desarrollo de las DCs (*Belz y Nutt 2012*), mostraban una cinética de expresión ascendente durante la fase temprana de diferenciación de las DCs, alcanzando, en el caso de PU.1, valores muy altos a las 20 horas de cultivo. Analizamos también la modulación de la expresión de ID2 e ID3. La expresión de ID3 era baja en los monocitos aunque se multiplicaba por un factor de 2 durante este corto periodo de tiempo (Fig. 16). Sin embargo, los niveles de transcripción de ID2 en los monocitos eran los más altos de entre todos los genes estudiados. Es reseñable su drástica reducción durante las tres primeras horas de cultivo, reducción que era transitoria puesto que a las 20 horas los valores volvían a sus niveles iniciales (Fig. 16).

Aunque no podemos descartar cambios en otros genes, de acuerdo con el efecto modulador pero no inhibidor de Wnt5a en la diferenciación de las DCs, durante las primeras horas de cultivo en los monocitos tratados con Wnt5a observábamos una regulación normal de la mayor parte de los genes analizados (Fig. 16). No obstante, el tratamiento con Wnt5a bloqueaba la reducción del 50% en los niveles de ID2 que se producía en los monocitos control a las 3 horas de cultivo, induciendo un incremento de su transcripción respecto a la condición inicial del cultivo (Fig. 16). Además la presencia de Wnt5a en estos cultivos inhibía parcialmente el aumento en la expresión de IRF3 y PU.1 que se observaba en los monocitos control durante las siguientes 17 horas de cultivo (Fig. 16). Asimismo, a las 20 horas del inicio del proceso de diferenciación Wnt5a indujo un descenso significativo en los niveles de transcripción de IRF8 respecto a las condiciones control, que se mantuvo hasta los 6 días de cultivo (Fig. 12A). Por su parte, Wnt3a sólo reducía parcialmente el incremento en la expresión de IRF3 que se produce en los monocitos control a las 20 horas de cultivo (Fig. 16). De acuerdo con estos resultados, las modificaciones inducidas por Wnt5a en la expresión de los diferentes genes estudiados durante las primeras horas de diferenciación de las DCs, podrían explicar las características funcionales de las Wnt5a-DCs.

## **2.7 El efecto de Wnt5a sobre la diferenciación de las DCs se produce durante las primeras horas de cultivo**

Nuestros resultados sugerían que el efecto de Wnt5a en la diferenciación de las DCs podría producirse durante las primeras horas de cultivo. Para comprobarlo, llevamos a cabo cultivos en los cuales los monocitos fueron tratados con Wnt5a sólo durante las primeras 24 horas (24hrWnt5a-DCs). Estos cultivos fueron comparados tanto con sus controles, que no recibían ningún tratamiento, como con cultivos en los que se mantuvo el tratamiento con Wnt5a durante los 6 días del proceso de diferenciación a DCs. En este grupo de experimentos valoramos sólo los parámetros fenotípicos y funcionales que se veían más afectados por el tratamiento con Wnt5a.

Efectivamente, observamos que la adición de Wnt5a sólo durante el primer día de cultivo era suficiente para modificar la diferenciación de los monocitos a DCs (Fig. 17). Así, tras 6 días en cultivo, en las 24hrWnt5a-DCs se observaban los mismo cambios en los niveles de CD14, CD86 o PD-L1 que en las Wnt5a-DCs (Fig. 17A). Lo mismo ocurría con la producción de IL-12, TNF $\alpha$  e IL-10 en respuesta a la estimulación con LPS (Fig. 17B) o con la capacidad aloestimuladora de las DCs, valorada mediante el establecimiento de MLR (Fig. 17C).



**Figura 17. Efecto de la adición de Wnt5a durante las primeras 24 horas de diferenciación.** Monocitos humanos fueron cultivados con GM-CSF/IL-4 para promover su diferenciación hacia DCs. La adición de Wnt5a se realizó o bien durante todo el cultivo (Wnt5a-DCs) o sólo durante las primeras 24 horas (24hr Wnt5a-DCs). En este caso a las 24 horas de cultivo, el medio de cultivo fue reemplazado por medio condicionado por monocitos cultivados durante 24 horas con GM-CSF/IL-4 para eliminar el Wnt5a sobrante. Tanto los cultivos control como los tratados con Wnt5a fueron sometidos a un proceso equivalente. (A) Análisis por citometría de flujo del fenotipo de las DCs a los 6 días de cultivo. En la figura se muestra el porcentaje de células CD14<sup>+</sup> y los valores de la IMF de CD86 y PD-L1 de las Wnt5a-DCs y 24hr Wnt5a-DCs respecto a las CTRL-DCs. (B) Las CTRL-, Wnt5a- y 24hr-Wnt5a-DCs fueron estimuladas con LPS durante 48 horas. A continuación, se midió por ELISA la concentración de IL-12, TNF $\alpha$  e IL-10 en los sobrenadantes de estos cultivos. (C) Se utilizaron estas DCs para establecer cultivos en MLR con linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive. Los sobrenadantes de estos cocultivos fueron recogidos a los 7 días y los niveles de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10 fueron analizados por ELISA. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 4 a 5 experimentos independientes, expresados como relativos al control (barras negras referidas como 100%). \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$ . Nótese corte en el eje Y en (A) y (C).

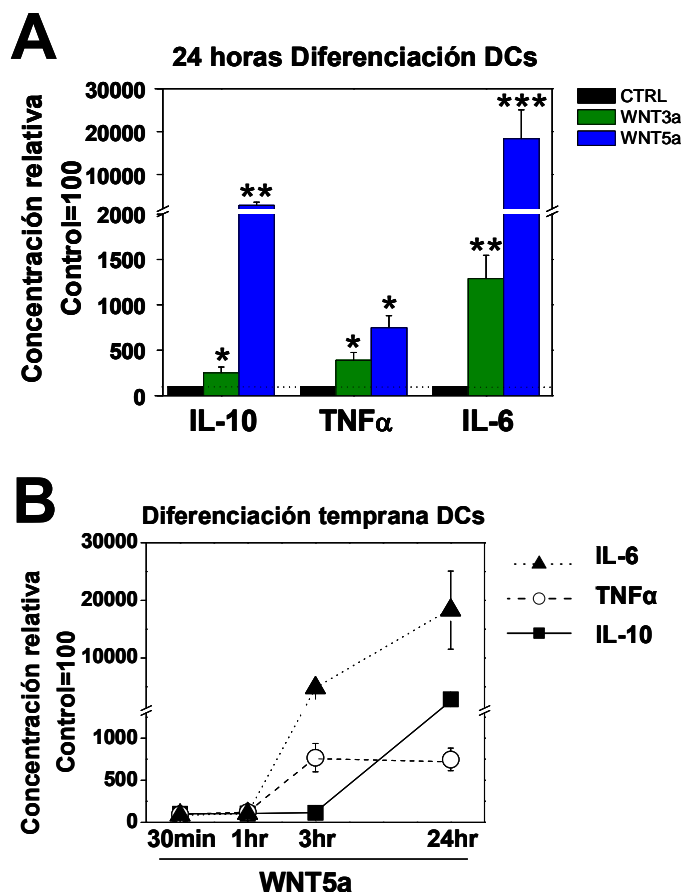
## 2.8 Los monocitos producen IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$ en respuesta a proteínas Wnt

Se ha descrito que diferentes factores solubles como IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-6 e IL-10 interfieren en la diferenciación de los monocitos hacia DCs (Torres-Aguilar y col. ; Chomarat y col. 2000; Delneste y col. 2003; Conti y Gessani 2008; Torres-Aguilar y col. 2010). Cuando analizamos la producción de estas citocinas durante las primeras 24 horas del proceso de diferenciación nos encontramos que, en condiciones control, los monocitos producían cantidades muy pequeñas de IFN $\gamma$  (<50 pg/ml), TGF $\beta$  (80-150 pg/ml), IL-6 (55-90 pg/ml) e IL-10 (<15pg/ml). Sin embargo, mientras que los niveles de IFN $\gamma$  y TGF $\beta$  no se veían afectados por la adición de proteínas Wnt, los sobrenadantes de estos cultivos contenían cantidades mucho mayores de IL-10 e IL-6. Así, el tratamiento con Wnt3a multiplicaba la producción de estas citocinas por factores de 2 y 13, respectivamente. De nuevo, los efectos de la adición de Wnt5a fueron mucho mayores, y en este caso los niveles de IL-10 se llegaban a multiplicar por 30 y los de IL-6 por 180 (Fig. 18A), detectándose hasta 16 ng/ml de esta citocina en los sobrenadantes de los cultivos tratados con Wnt5a.

La inducción en la secreción de IL-6 por Wnt5a era evidente a las 3 horas de cultivo, aunque fue a las 24 horas cuando encontramos los niveles más altos de esta citocina (Fig. 18B). Sin embargo, la secreción de IL-10 en los cultivos tratados con proteínas Wnt se hizo evidente más tarde, después de las primeras 24 horas de cultivo. Tras la inducción de la producción de IL-6 e IL-10, en los cultivos tratados con proteínas Wnt, sus niveles se mantenían por encima de los encontrados en los cultivos control hasta el sexto y último día de cultivo (datos no mostrados). Además, en ausencia de señalización GM-CSF/IL-4, tras 24 horas de cultivo los monocitos tratados con Wnt5a duplicaban la secreción de IL-6 e IL-10 (datos no mostrados), sugiriendo que las señales que inducen la diferenciación de las DCs podrían tener un efecto negativo sobre esta respuesta de los monocitos a Wnt5a.

En contraste con los efectos observados por nosotros tras el tratamiento con Wnt5a, Chomarat y colaboradores (2000) demostraron que la adición de dosis altas de IL-6 (100 ng/ml) a los cultivos de monocitos suplementados con GM-CSF/IL-4 redirigía su diferenciación hacia macrófagos, que mantenían la expresión de CD14 pero no adquirían la de CD1a (Chomarat y col. 2000). No obstante, en un trabajo posterior del mismo grupo se demostró que la adición simultánea de TNF $\alpha$  puede contrarrestar el efecto de IL-6 y redirigir su diferenciación hacia

DCs, inhibiendo la señalización M-CSF en los monocitos (Chomarat y col. 2003). A la vista de estos resultados, analizamos los niveles de TNF $\alpha$  en nuestros cultivos y observamos que el tratamiento con proteínas Wnt también promovía la secreción de TNF $\alpha$ , lo que podría estar produciendo un efecto similar al propuesto en este trabajo (Chomarat y col. 2003) permitiendo así la diferenciación hacia DCs (Fig. 18A y 18B).



**Figura 18.** La señalización Wnt induce la secreción de IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$  durante la fase temprana de la diferenciación de las DCs. Monocitos humanos fueron cultivados con GM-CSF/IL-4 tanto en ausencia como en presencia de Wnt3a o Wnt5a. El sobrenadante de estos cultivos fue recogido en diferentes momentos del proceso de diferenciación (30 minutos, 1, 3 y 24 horas) y la concentración de IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$  fue analizada por ELISA. (A) Concentración relativa de IL-10, TNF $\alpha$  e IL-6 tras 24 horas de cultivo. La concentración absoluta en los cultivos control fue: IL-6: 77,4 $\pm$ 22 pg/ml; IL-10: 9 $\pm$ 4 pg/ml; TNF $\alpha$ : 117 $\pm$ 41 pg/ml. (B) Cinética de producción de IL-6, IL10 y TNF $\alpha$  en los cultivos tratados con Wnt5a respecto a los cultivos control. Análisis de la producción de estas citocinas tras 30 minutos, 1, 3 y 24 horas de cultivo. Nótese el corte en el eje Y y el cambio de escala después del corte. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes, expresados como relativos al control (barras negras referidas como 100%). \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$ .

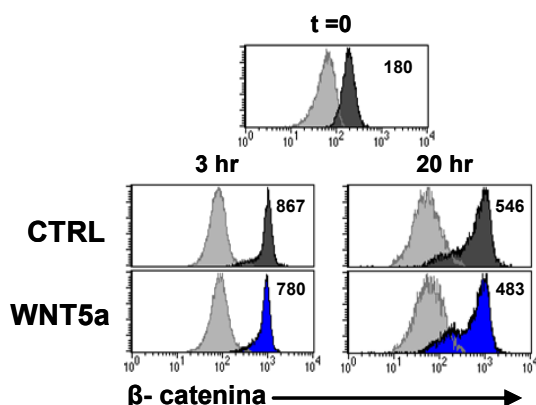
Es importante remarcar en este momento que la inducción de la secreción de estas citocinas en los monocitos no se debía a un efecto estimulante del detergente CHAPS que formaba parte del solvente de las proteínas Wnt, puesto que a la baja dosis a la que se encuentra (un 1% que pasa a ser 0,001% tras la dilución), no producía ningún efecto ni en la secreción de estas citocinas ni en la diferenciación de las DCs (datos no mostrados). Es más, cuando adicionamos la misma dosis de Wnt5a durante la diferenciación de progenitores CD34<sup>+</sup> de sangre de cordón umbilical a DCs, ésta no estimulaba la producción de citocinas (datos no mostrados). Finalmente, como luego comentaremos, Wnt5a tampoco era capaz de inducir la maduración de las moDCs.

### 3. EL EFECTO DE WNT5a DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS moDCs ES DEPENDIENTE DE LA SEÑALIZACIÓN WNT NO CANÓNICA

Los resultados obtenidos hasta el momento demostraban que, en presencia de proteínas Wnt, el proceso de diferenciación de monocitos humanos a DCs sufría modificaciones importantes, siendo las alteraciones obtenidas tras el tratamiento con Wnt5a más significativas que las obtenidas tras el tratamiento con Wnt3a. Por esta razón, decidimos analizar la vía de señalización Wnt a través de la cual Wnt5a estaba interfiriendo en la diferenciación de las DCs.

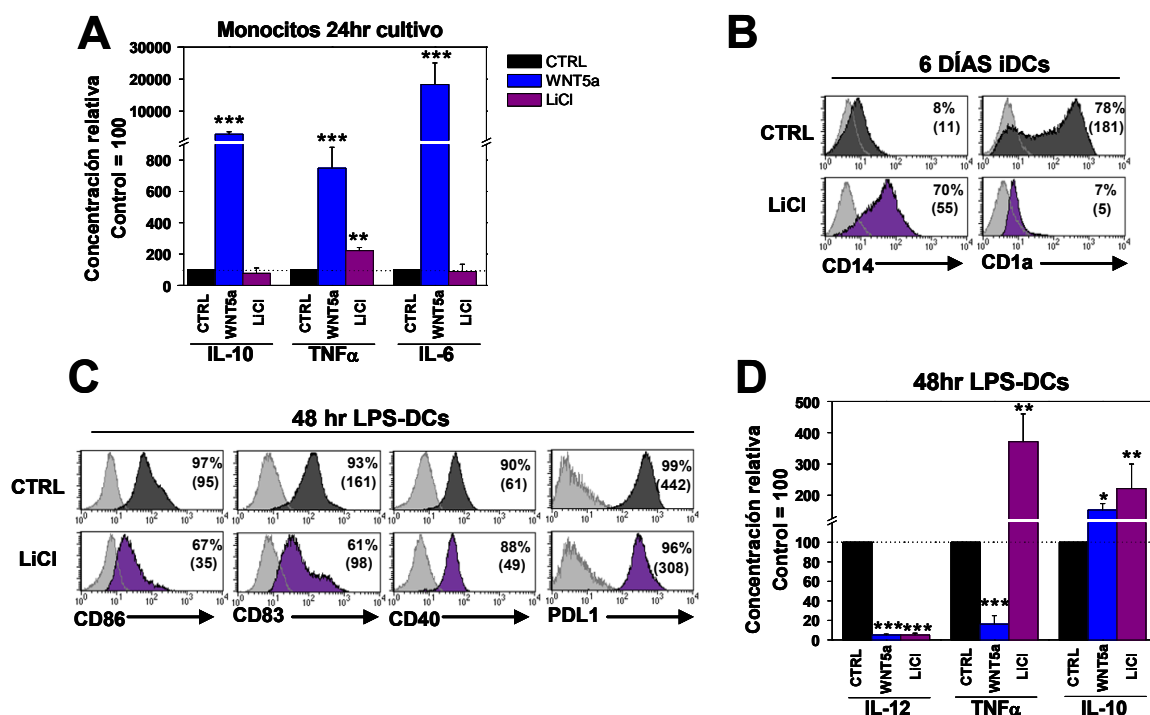
Como ya comentamos en la introducción, la interacción de las proteínas Wnt con sus receptores en la superficie celular puede resultar en una gran variedad de respuestas intracelulares. Tradicionalmente se ha clasificado las diferentes rutas de señalización activadas por proteínas Wnt en función de si estabilizaban o no  $\beta$ -catenina, llamándose rutas canónica o no canónicas, respectivamente. En la actualidad se sabe que la señalización Wnt es mucho más compleja. Un mismo ligando Wnt puede unirse a diferentes receptores, o activar dos rutas diferentes uniéndose a un mismo receptor a través de diferentes mecanismos (*Sato y col. 2010*). Por lo tanto, a priori parecía realmente complejo el análisis de los componentes de las distintas rutas de señalización Wnt a través de los cuales Wnt5a podría estar interfiriendo en la diferenciación de las DCs.

Puesto que la estabilización de  $\beta$ -catenina a través de la inhibición de GSK3, es un punto “clave” en la ruta canónica de señalización Wnt (ver Esquema 2 en Introducción) comenzamos analizando sus niveles mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que en condiciones control los monocitos incrementaban sus niveles de  $\beta$ -catenina en las primeras 3 horas de cultivo en presencia de GM-CSF/IL-4, pero estos niveles se reducían durante las siguientes 20 horas (Fig. 19). La adición de Wnt5a a los cultivos no sólo no produjo niveles de  $\beta$ -catenina mayores que en los cultivos control, sino que, por el contrario, este tratamiento parecía interferir ligeramente con la acumulación de esta proteína.



**Figura 19. Niveles de  $\beta$ -catenina en monocitos cultivados en presencia de Wnt5a.** Monocitos humanos fueron cultivados con GM-CSF/IL-4 tanto en ausencia como en presencia de Wnt5a. Análisis por citometría de flujo de la expresión intracelular de  $\beta$ -catenina en monocitos ( $t = 0$ ) y tras 3 o 20 horas de cultivo. En cada histograma se muestra la IMF total. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes.

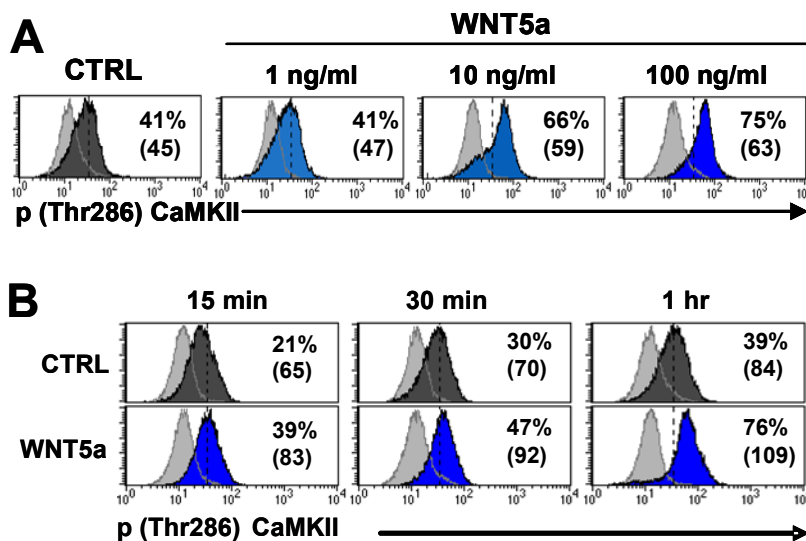
Este ligero efecto negativo de Wnt5a sobre los niveles de  $\beta$ -catenina nos sugería que los efectos de Wnt5a no eran ocasionados por la activación de la ruta canónica. De hecho, la inhibición de GSK3 y la subsiguiente estabilización de  $\beta$ -catenina durante la diferenciación de los monocitos a DCs, producida por el tratamiento de los cultivos con LiCl, no mimetizaba los efectos de Wnt5a (Fig.20). En primer lugar, a diferencia de lo observado tras el tratamiento con Wnt5a (Fig.18), la adición de LiCl no indujo la producción de IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  en las primeras horas de cultivo de los monocitos (Fig 20A). No obstante, la adición de LiCl producía una acumulación de células CD14<sup>+</sup> mucho más importante que la obtenida por el tratamiento con Wnt5a, y, al contrario que éste, bloqueaba la adquisición de CD1a. (Fig 20B). Tras estimulación con LPS, las células producidas bajo la influencia del LiCl mostraron, como las Wnt5a-DCs, una expresión significativamente menor de CD86 y CD83 mientras que la expresión de CD40 y PD-L1 no se vio afectada (Fig 20C). En cuanto a su capacidad para producir citocinas en respuesta a LPS, al igual que las Wnt5a-DCs, las células producidas en presencia de LiCl apenas producían IL-12 y secretaban más IL-10 que sus controles pero, al contrario que las Wnt5a-DC, secretaban una cantidad mayor de TNF $\alpha$  (Fig 20D).



**Figura 20. El tratamiento con LiCl no mimetiza los efectos de Wnt5a en la diferenciación de las DCs.** Monocitos humanos fueron cultivados con GM-CSF/IL-4 en presencia o ausencia de Wnt5a o LiCl (10  $\mu$ M). (B y C) Análisis por citometría de flujo del fenotipo de las iDCs (B) y de las LPS-DCs tras 48 horas de estímulo (C). Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. (A y D) Sobrenadantes de monocitos tras 24 horas de cultivo (A) y de LPS-DCs tras 48 horas de estimulación (D) fueron recuperados y en ellos se analizó la concentración de diferentes citocinas. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 4 experimentos independientes, expresados como relativos al control (referidas como 100%). Nótese el corte en el eje Y y el cambio de escala después del corte. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$ .

El fenotipo de las células producidas bajo la influencia del LiCl, concordaba con lo observado por Rodionova y colaboradores (2007) que proponen que la actividad de GSK3 es necesaria para la diferenciación de los monocitos en DCs, puesto que el uso de inhibidores de esta quinasa dirige su diferenciación hacia células macrofágicas (Rodionova y col. 2007).

Por otra parte, a través de una ruta no canónica, Wnt5a puede estimular la movilización intracelular de  $Ca^{+2}$ , que actúa como segundo mensajero y desencadena la activación de CaMKII (Kuhl y col. 2000). Apoyando esta posibilidad, mediante estudios por citometría de flujo nuestros resultados demostraron que, aunque en las CTRL-DCs detectábamos niveles basales de activación de CaMKII, el tratamiento con Wnt5a inducía un aumento dosis dependiente en los niveles de fosforilación de esta quinasa (Fig. 21.A). Así, como se observa en la Figura 21B, tanto el porcentaje de células p(Thr<sup>286</sup>)-CaMKIIα positivas como la intensidad media de su fluorescencia eran mayores en los cultivos tratados con Wnt5a. Este efecto se detectaba desde los primeros 15 minutos de tratamiento, aunque era más notable tras la primera hora de cultivo (Fig. 21.B).

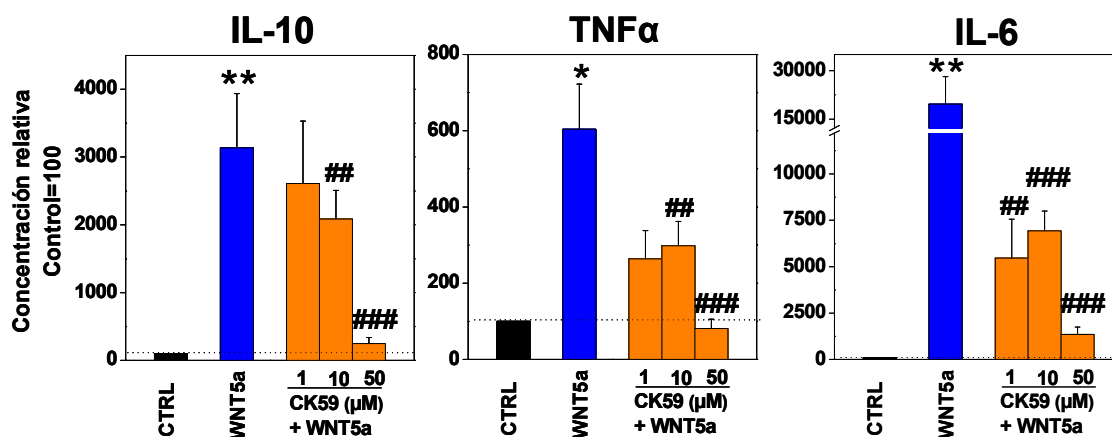


**Figura 21. Cuantificación de los niveles de fosforilación de CaMKII en monocitos tratados con Wnt5a.** Análisis por citometría de flujo de los niveles intracelulares de p(Thr<sup>286</sup>-CaMKIIα. (A) Monocitos tras 1 hora de cultivo en condiciones control o en presencia de dosis crecientes de Wnt5a (1, 10 o 100 ng/ml). (B) Monocitos cultivados durante 15, 30 minutos o 1 hora en presencia o no de 100ng/ml de Wnt5a. El porcentaje de células positivas, determinado de acuerdo al control negativo (histograma en gris), y la IMF total (en paréntesis) se muestra en cada histograma. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

A continuación analizamos si la inhibición específica de CaMKII simultánea al tratamiento con Wnt5a, podría recuperar la diferenciación y función normales de las DCs. Para ello inhibimos la actividad de la CamKII mediante la adición a los cultivos del inhibidor CK59. Para impedir el posible efecto tóxico de un tratamiento prolongado con el inhibidor de la CaMKII restringimos la presencia de Wnt5a y CK59 a las primeras 24 horas de cultivo. El

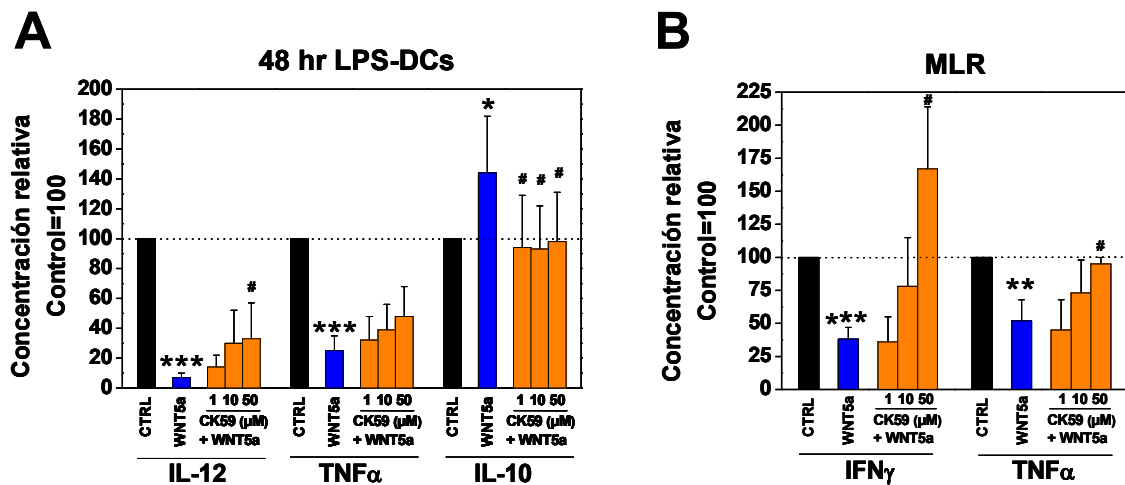
estudio de estos cultivos reveló que, de una manera dosis dependiente, CK59 bloqueaba prácticamente la secreción de citocinas inducida en los monocitos por Wnt5a durante las primeras horas de cultivo con GM-CSF/IL-4 (Fig 22).

### 24 horas Diferenciación DCs



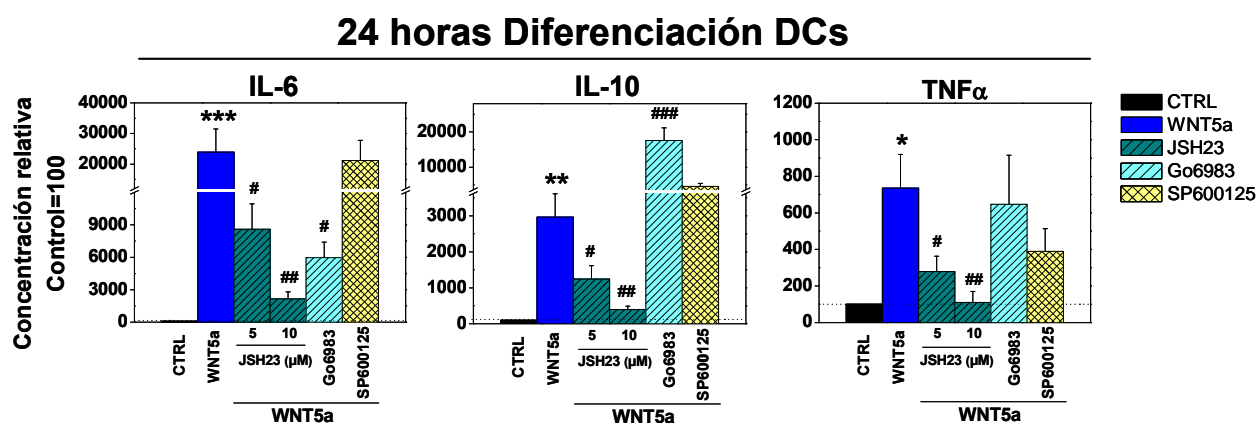
**Figura 22.** Niveles de citocinas en los cultivos de monocitos tratados con el inhibidor de CaMKII simultáneamente a la adición de Wnt5a. Monocitos humanos fueron cultivados con GM-CSF/IL-4 en presencia o ausencia de Wnt5a sólo o en combinación con diferentes dosis del inhibidor específico para CaMKII (CK59; 1-50  $\mu$ M). Tras 24 horas de cultivo, se retiró el medio determinándose la concentración de IL-10, TNF $\alpha$  e IL-6. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 4 experimentos independientes, expresados como relativos al control (barras negras referidas como 100%). Nótese el corte en el eje Y y el cambio de escala después del corte en la gráfica de IL-6. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; significación de los cultivos tratados con Wnt5a respecto al cultivo control. ##  $p \leq 0.005$ ; ###  $p \leq 0.0005$ ; significación de cultivos tratados con Wnt5a más el inhibidor de CaMKII respecto a los cultivos tratados con Wnt5a.

En el mismo sentido, la inhibición de CaMKII restauraba, en parte, las alteraciones fenotípicas encontradas en las Wnt5a-DCs restableciendo la expresión, detectada en las CTRL-DC, de CD14 y CD86, entre otros marcadores (datos no mostrados). En cuanto a los cambios funcionales observados en las Wnt5a-DCs, el tratamiento con CK59 restauró los niveles de IL-10 en los cultivos de DCs estimuladas con LPS (Fig. 23A) así como la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en los cultivos en MLR (Fig. 23B). Sin embargo, la inhibición de CaMKII no recuperó la capacidad de las Wnt5a-DCs para producir IL-12 y TNF $\alpha$  tras su estimulación con LPS (Fig. 23A). Estos resultados nos sugerían que, aunque la activación de la CaMKII estaba mediando parte de los efectos de Wnt5a, probablemente otra de las vías no canónicas podría estar también participando.



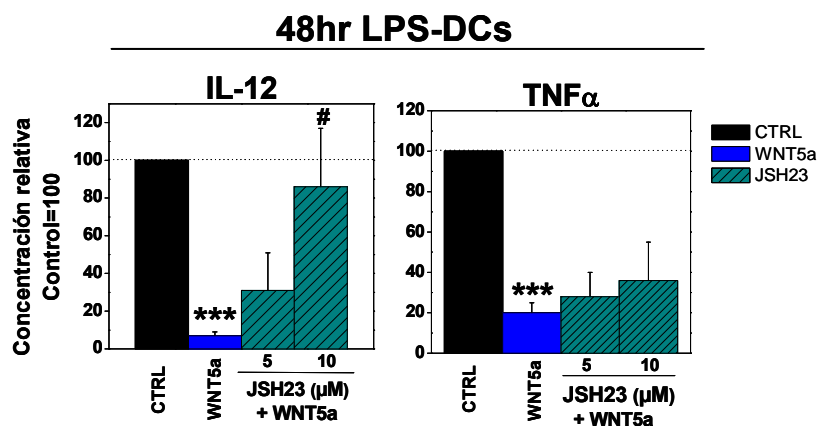
**Figura 23. Efectos sobre la funcionalidad de las DCs tras la inhibición de CaMKII durante las primeras horas de cultivo de los monocitos.** Monocitos humanos fueron tratados como se describe en la figura anterior. Tras 24 horas de cultivo se retiró el tratamiento, sustituyendo el medio de cultivo por medio procedente de cultivos de monocitos mantenidos durante esas 24 horas en condiciones control con GM-CSF/IL-4. Tanto los cultivos control como los tratados fueron sometidos a un proceso equivalente. Tras 6 días, las DCs obtenidas fueron estimuladas con LPS (100 ng/ml). Los sobrenadantes de los cultivos de DCs tras 48 horas de estímulo (A) y de los cultivos de MLR (6 días) establecidos con estas DCs (B) fueron recuperados y la concentración de diferentes citocinas fue analizada en ellos. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 4 experimentos independientes, expresados como relativos al control (barras negras referidas como 100%). \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*  $p \leq 0.0005$ ; significación respecto al cultivo control. #  $p \leq 0.05$ ; significación respecto a los cultivos de Wnt5a-DCs.

Como consecuencia de la movilización de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular Wnt5a puede, además de activar CaMKII, promover la activación de PKC y, de forma independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , puede señalar vía JNK (Gao y Chen 2010; Rao y Kuhl 2010). La inhibición de PKC, utilizando el inhibidor específico Go6983 durante las 24 horas de tratamiento con Wnt5a, fue capaz de reducir la cantidad de IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos de monocitos pero incrementó dramáticamente los niveles de IL-10 (Fig. 24). Sin embargo, el tratamiento con un inhibidor específico de JNK, SP600125, no modificó significativamente la cantidad de IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$  secretada por los monocitos en respuesta a Wnt5a (Fig. 24). Consecuentemente, la inhibición de estas rutas de señalización no consiguió recuperar la producción de IL-12 y TNF $\alpha$  por parte de las Wnt5a-DCs (datos no mostrados).



**Figura 24. Niveles de citocinas producidos por los monocitos cultivados durante 24 horas en presencia de inhibidores de distintas rutas de señalización Wnt.** Monocitos humanos fueron cultivados con GM-CSF/IL-4 en presencia o no de Wnt5a sólo o en combinación con diferentes dosis de inhibidores específicos para NF-κB (JSH-23; 5-10 μM), PKC (Go6983; 5μM) o JNK (SP600125; 20μM). Tras 24 horas, los sobrenadantes fueron recuperados y se midió en ellos la concentración de diferentes citocinas. Los datos representan la media ± SD de 3 a 4 experimentos independientes, expresados como relativos al control (barras negras referidas como 100%). Nótese en algunas gráficas el corte en el eje Y y el cambio de escala después del corte. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ ; significación de los cultivos tratados con Wnt5a respecto al cultivo control #  $p \leq 0.05$ ; ##  $p \leq 0.005$ ; significación de cultivos tratados con Wnt5a más los distintos inhibidores respecto a los cultivos tratados con Wnt5a.

También se ha demostrado que Wnt5a puede activar NF-κB a través de un mecanismo que no se conoce por completo (Bradley y Drissi 2010; Kim y col. 2010; Kim y col. 2012). Siguiendo una estrategia similar a la de los experimentos anteriores, demostramos que la inhibición de NF-κB durante las primeras 24 horas de cultivo no sólo era capaz de reducir significativamente la secreción de IL-6 e IL-10 provocada por el tratamiento con Wnt5a sino que además conseguía restaurar la producción de IL-12 por las Wnt5a-DCs (Fig. 24 y 25). Concluimos por tanto que, junto a CaMKII, la actividad de NF-κB cumple un papel en el efecto de Wnt5a sobre la diferenciación de los monocitos en DCs. No obstante, ninguno de los inhibidores utilizados fue capaz de recuperar la producción de TNFα por parte de las Wnt5a-DCs. Por lo tanto, Wnt5a podría estar activando otras rutas alternativas que mediarían el efecto observado sobre esta citocina.



**Figura 25. Niveles de IL-12 y TNF $\alpha$  en cultivos de DCs diferenciadas en presencia del inhibidor de NF- $\kappa$ B.** Monocitos humanos fueron tratados como se describe en la figura anterior. Tras 24 horas de cultivo se retiró el tratamiento como se explica en la figura 23. Los sobrenadantes de los cultivos de DCs tras 48 horas de estímulo con LPS fueron recuperados y se midió en ellos la cantidad de IL-12 y TNF $\alpha$ . Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 4 experimentos independientes, expresados como relativos al control (barras negras referidas como 100%). \*\*\*  $p \leq 0.0005$ ; significación de Wnt5a-DCs respecto a CTRL-DCs. #  $p \leq 0.05$ ; significación de DCs tratadas con Wnt5a más el inhibidor de NF- $\kappa$ B respecto a Wnt5a-DCs.

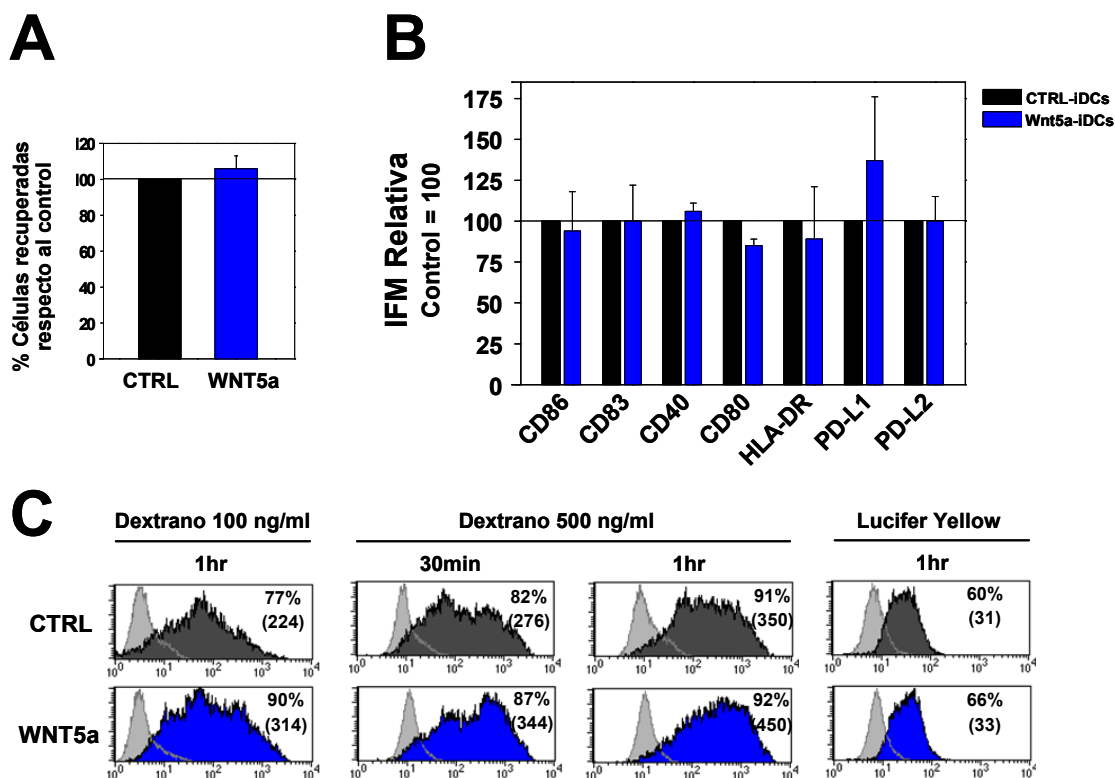
#### **4. WNT5a MODULA LA MADURACIÓN DE LAS DCs Y PARTICIPA EN SU POSTERIOR FUNCIÓN**

Una vez estudiado el efecto del incremento de la señalización Wnt5a durante la diferenciación de las moDCs humanas y puesto que, como hemos comentado anteriormente, Wnt5a se postula como una molécula cuya producción se asocia a procesos de inflamación, sepsis y cáncer, analizamos su posible papel en la maduración y posterior función de las DCs, ya que es fácil pensar que estas células se pueden ver expuestas a Wnt5a antes y durante su exposición a estímulos madurativos.

Para ello, obtuvimos DCs a partir de monocitos humanos y, en este caso, tras 6 días de cultivo les añadimos el ligando Wnt5a en diferentes momentos estableciendo 5 grupos experimentales distintos (Esquema 6 en Material y Métodos). Los dos primeros se obtuvieron cultivando iDCs en presencia (Wnt5a-iDCs) o ausencia (CTRL-iDCs) de Wnt5a durante 24 horas. A continuación se estimularon durante 24 horas las CTRL-iDCs, con LPS sólo (CTRL-maDCs) o en combinación con Wnt5a (Wnt5a-maDCs). Por su parte las Wnt5a-iDCs también fueron estimuladas con LPS obteniéndose DC maduras que habían sido previamente tratadas con Wnt5a (Pre-Wnt5a-maDCs)

##### **4.1 Wnt5a no supone un estímulo madurativo para las DCs**

Inicialmente analizamos la respuesta de las DCs inmaduras añadiendo Wnt5a durante 24 horas. Estudiamos su fenotipo y capacidad endocítica, y a continuación, el efecto en su posterior maduración. Como se observa en la Figura 26A, el tratamiento con Wnt5a no modificó significativamente el número de células recuperadas tras 24 horas de cultivo. Además, parecía no suponer un estímulo madurativo para las DCs puesto que no indujo la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86, CD80 y CD40, ni modificó la expresión de moléculas como HLA-DR, PD-L1 y PD-L2, que típicamente aumentan tras un estímulo madurativo (Fig. 26B).



**Figura 26. Análisis del efecto del incremento de la señalización Wnt5a en las iDCs.** Monocitos humanos fueron cultivados con GM-CSF/IL-4 para promover su diferenciación hacia DCs. Tras 6 días, se añadieron 100 ng/ml de Wnt5a a los cultivos y después de 24 horas de tratamiento se analizó el efecto del mismo usándose como controles cultivos que no habían sido tratados. (A) Porcentaje del número de células recuperadas respecto al control (referido como 100%). (B) Fenotipo de las Wnt5a-iDCs respecto al control. En la gráfica de barras se muestra la IMF de diferentes marcadores de superficie en las Wnt5a-iDCs respecto a las CTRL-iDCs (referidas como 100%). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 5 experimentos independientes. (C) Análisis de la capacidad endocítica de las Wnt5a-iDCs. Tras 24 horas de tratamiento con o sin Wnt5a, las iDCs fueron incubadas con Dextrano (100 ng/ml o 500 ng/ml) o Lucifer Yellow (1 mg/ml) a 37°C. treinta minutos o 1 hora después, su internalización fue medida por citometría de flujo. Como controles negativos se incubaron iDCs con los mismos tratamientos a 0° C (histogramas en gris). La IMF (en paréntesis) se muestra en cada histograma. Los datos mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

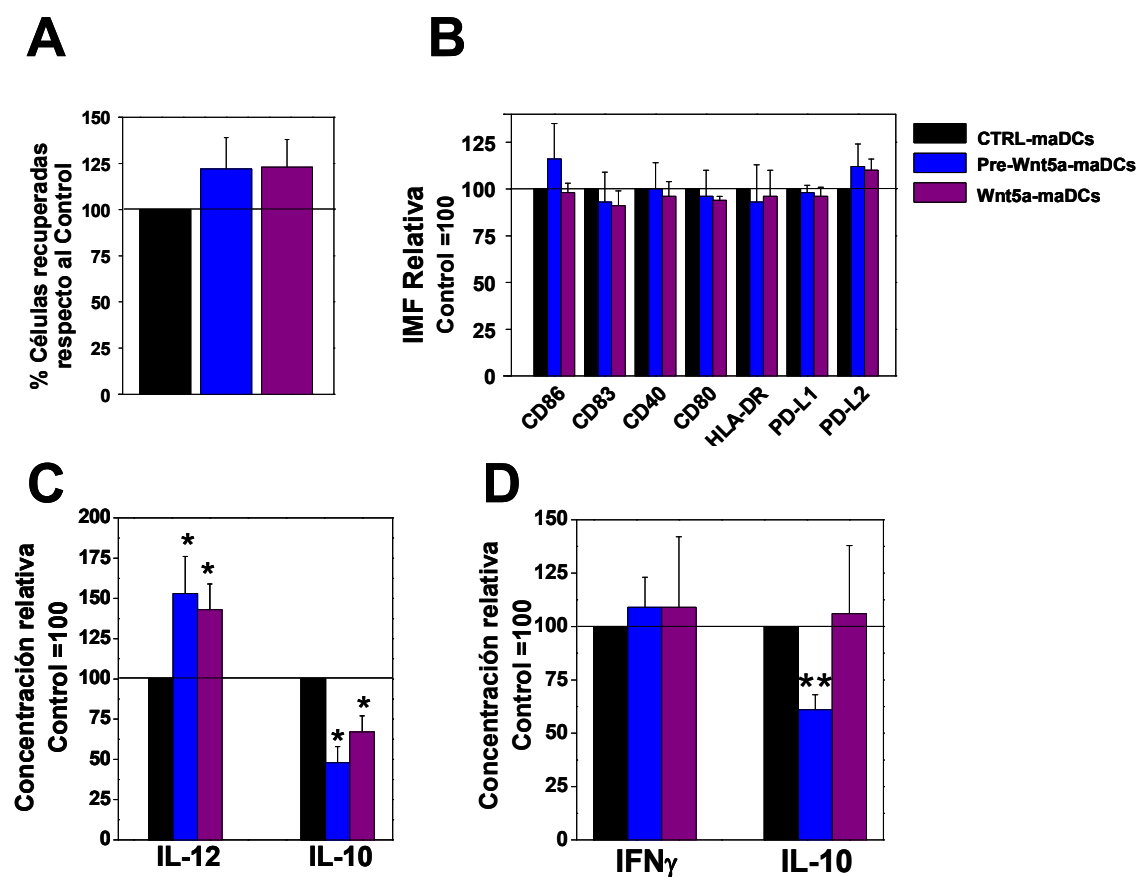
Asimismo los niveles de citocinas como IL-12, IL-10, TNF $\alpha$  e IL-6 en estos cultivos eran muy bajos o estaban por debajo del límite de detección de los sistemas utilizados (datos no mostrados), demostrando que Wnt5a tampoco inducía su producción. No obstante, cuando analizamos por citometría de flujo la capacidad de endocitosis mediada por receptor o macropinocitosis de estas DCs, observamos que el tratamiento con Wnt5a favorecía la capacidad endocítica mediada por receptor de estas células, mientras que no modificaba su capacidad de llevar a cabo macropinocitosis (Fig. 26C).

## 4.2 El incremento de la señal Wnt5a modifica ligeramente la respuesta de las DCs a LPS

A continuación analizamos el efecto de la adición de Wnt5a antes y durante la maduración de las DCs en respuesta a LPS. Para ello tratamos las DCs inmaduras con Wnt5a (100 ng/ml) bien durante las 24 horas previas al estímulo (pre-Wnt5a-maDCs) o bien simultáneamente a él (Wnt5a-maDCs). Llevamos en paralelo un grupo control estimulado con LPS (CTRL-maDCs).

De nuevo, Wnt5a no produjo cambios significativos en los niveles de expresión de las proteínas de membrana analizadas en las DCs (CD86, CD83, CD40, CD80, HLA-DR, PD-L1 y PD-L2). Tampoco observamos modificaciones significativas en el número de células recuperadas tras el estímulo vía TLR4 (Fig. 27A y 27B). Sin embargo, tanto en el pretratamiento con Wnt5a como el tratamiento simultáneo a la estimulación con LPS indujeron que las DCs produjeran más IL-12 y menos IL-10 (Fig. 27C).

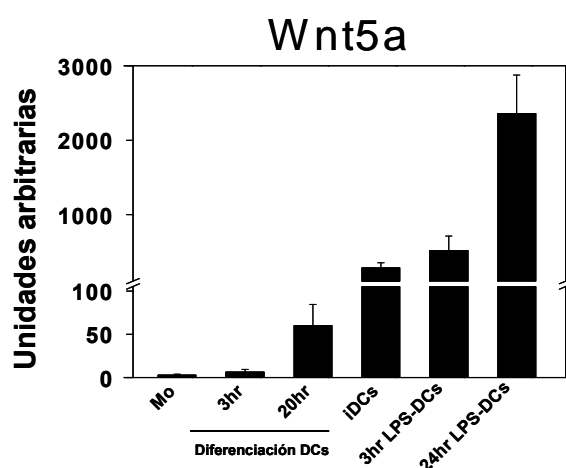
Notablemente los cambios observados en la producción de IL-10 e IL-12 por parte de las DCs que habían sido tratadas con Wnt5a, no parecían verse proporcionalmente reflejados en su capacidad aloestimuladora, analizada mediante el establecimiento de MLR con linfocitos T CD4 *naive*. Así, observamos cómo la adición de Wnt5a simultánea al LPS no se tradujo en cambios en la expansión de los linfocitos T *naive* (datos no mostrados) ni en los niveles de IFN $\gamma$  o IL-10 en los sobrenadantes de los MLR. Algo similar encontramos cuando establecimos MLR con las pre-Wnt5a-maDCs, aunque en este caso sí se detectó una reducción de un 40% en los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de estos cocultivos. Sin embargo esta reducción no se reflejaba en un mayor número de células T recuperadas ni en un incremento significativo de los niveles de IFN $\gamma$  en los sobrenadantes de los MLR (Fig. 27D).



**Figura 27. Análisis de la funcionalidad de las DCs tratadas con Wnt5a antes y durante su estimulación con LPS.** Para la obtención de las pre-Wnt5a-maDCs, se añadió Wnt5a (100 ng/ml) a las iDCs y tras 24 horas de cultivo se retiró el medio y se añadió LPS (100 ng/ml). Las Wnt5a-maDCs se obtuvieron añadiendo simultáneamente Wnt5a y el estímulo madurativo. En paralelo se establecieron cultivos control a los que no se les trató con Wnt5a (CTRL-maDCs). Tras 24 horas de cultivo en presencia de LPS se cuantificó: (A) el número de células recuperadas; (B) la expresión (IMF), por citometría de flujo, de diferentes marcadores de superficie; (C) la concentración de IL-12 e IL-10 producidos en estos cultivos. (D) Las DCs así obtenidas se utilizaron para estimular linfocitos T naive en cultivos en MLR. Tras 7 días de cocultivo se recuperaron los sobrenadantes y se analizó la concentración de IFN $\gamma$  e IL-10 por ELISA. En todos los casos los datos se representan como el porcentaje de los valores encontrados en los cultivos tratados respecto a sus controles individuales (CTRL-maDCs, referidas como 100%), obteniéndose la media a partir de 3-4 experimentos  $\pm$  SD. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ .

### 4.3 Las DCs inmaduras expresan Wnt5a e incrementan drásticamente su producción tras estimulación

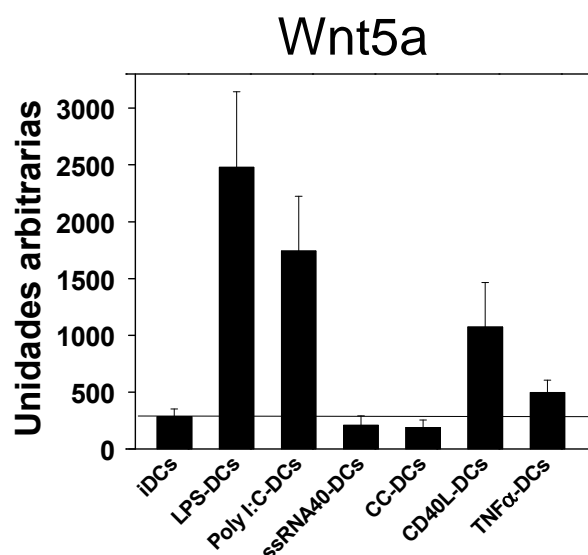
A la vista de los resultados anteriores, la adición de Wnt5a exógeno tenía un efecto mínimo sobre las moDCs, cuando se adicionaba en el momento de su activación. Resultados de Lehtonen y colaboradores (2007) indicaban que distintos tipos de DCs humanas expresaban Wnt5a y que esta expresión se incrementaba tras la estimulación con IL-4 (Lehtonen y col. 2007). En base a estos resultados quisimos cuantificar en nuestro laboratorio dicha expresión tanto durante el proceso de diferenciación de las moDCs como durante su estimulación. El análisis por PCR cuantitativa mostró que tanto los monocitos aislados como los que habían iniciado el proceso de diferenciación hacia DCs expresaban niveles mínimos de Wnt5a. Es decir, en una condición control, las etapas iniciales de la diferenciación de las DCs a partir de monocitos se llevarían a cabo bajo la influencia de niveles muy bajos de Wnt5a. En contraste, el nivel de transcripción de Wnt5a se incrementaba 100 veces en las DCs ya diferenciadas con respecto a lo que habíamos detectado en los monocitos. No obstante esta expresión se incrementaba hasta 10 veces más cuando las DCs maduraban en respuesta a LPS (Fig. 28). Por lo tanto podemos decir que, en la condición control, las DCs tanto en su estado inmaduro como durante su maduración estarían en presencia de Wnt5a endógeno que podría señalar de forma autocrina. Es esperable, entonces, que la adición de dosis extras de Wnt5a tenga una repercusión menor, tal y como nuestros resultados parecen indicar.



**Figura 28.** Modulación de la expresión de Wnt5a durante la diferenciación de los monocitos en DCs y su posterior maduración. Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de Wnt5a en distintas poblaciones: monocitos recién aislados (Mo) y tras 3 y 20 horas de cultivo con GM-CSF/IL-4; iDCs y LPS-DCs tras 3 y 24 horas de estimulación (se usaron 100 ng/ml de LPS). La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de GAPDH que fue utilizado como control endógeno. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 4 a 9 experimentos independientes. Nótese el corte en el eje Y y el cambio de escala después del corte.

A continuación comprobamos si otros estímulos capaces de inducir la maduración de estas células tenían el mismo efecto sobre la expresión de Wnt5a en las DCs y, por tanto, la producción de Wnt5a podía considerarse una característica general de las DCs maduras. Utilizamos o bien otros estímulos TLR como Poly I:C o ssRNA40, o bien promovimos la

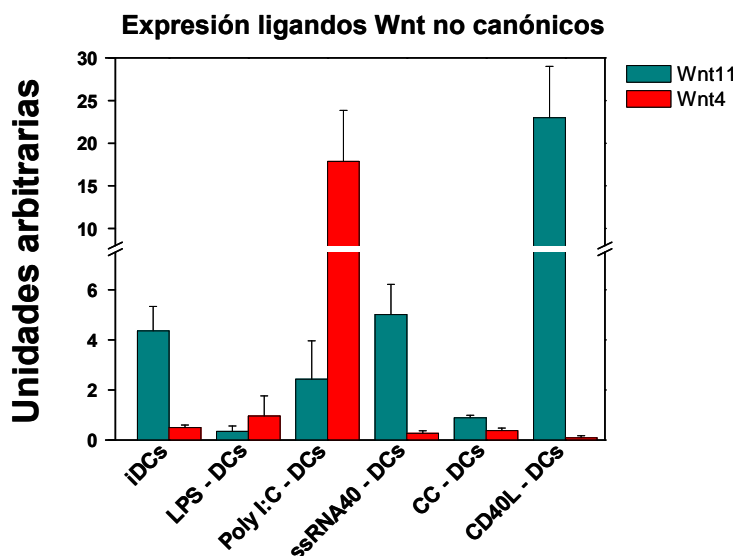
activación de las DCs de forma independiente de receptores TLR usando un cóctel de citocinas pro-inflamatorias compuesto por IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y PGE2, o el ligando de CD40 o simplemente la citocina pro-inflamatoria TNF $\alpha$ . En la Figura 29 se observa como no todos los estímulos producen el mismo efecto en la expresión de Wnt5a por parte de las DCs. Mientras que la estimulación con Poly I:C tenía un efecto muy similar al observado en las LPS-DCs, el otro estímulo TLR estudiado, ssRNA40, no indujo un incremento en la producción de Wnt5a, sino que los valores de éste eran menores que los observados en las DCs en su condición inmadura. Por otra parte, los efectos observados en las DCs tras la estimulación independiente de TLR indicaban que, mientras que la activación mediada por el ligando de CD40 sí era capaz de inducir la producción de Wnt5a, la estimulación con TNF $\alpha$ , sólo o en combinación con IL-1 $\beta$ , IL-6, y PGE2, apenas inducía o incluso reducía la expresión de Wnt5a respecto a las iDCs (Fig. 29)



**Figura 29. Expresión de Wnt5a en DCs inmaduras y tras su maduración con distintos estímulos.** Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de Wnt5a en DCs en su condición inmadura (iDCs) y tras ser estimuladas 24 horas con LPS (100 ng/ml), Poly I:C (12,5  $\mu$ g/ml) ssRNA4 (1  $\mu$ g/ml), coctel de citocinas (CC) (compuesto por IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-6 (15 ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml) y PGE2 (1  $\mu$ g/ml)), CD40L (1  $\mu$ g/ml) o TNF $\alpha$  (10ng/ml). La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de GAPDH que fue utilizado como control endógeno. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 3 a 9 experimentos independientes.

#### 4.4 Wnt5a es el principal ligando Wnt no canónico expresado por las DCs en su condición inmadura y tras su maduración

A continuación analizamos si, además de Wnt5a, las moDCs expresaban otros ligandos Wnt considerados no canónicos como Wnt4 y Wnt11. Como se observa en la Figura 30, los niveles de transcrito de Wnt4 y Wnt11 eran, en todos los casos, muy bajos o incluso indetectables. Si comparamos con los datos mostrados en la Figura 29 podemos concluir que Wnt5a es el principal ligando Wnt no canónico expresado por las DCs antes y después de su maduración con distintos estímulos.



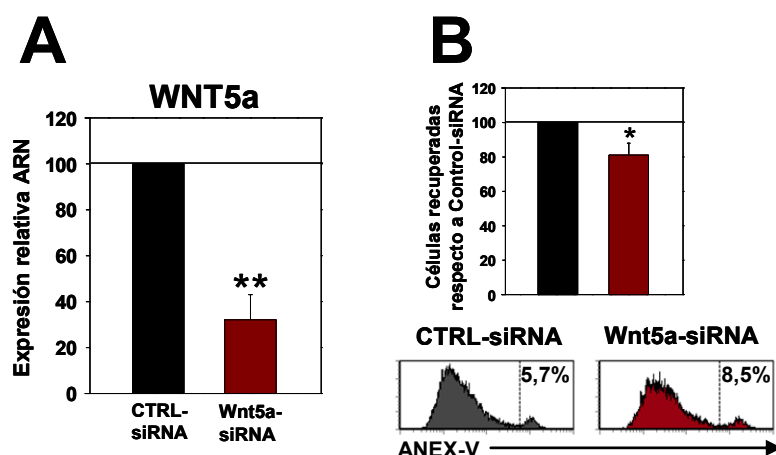
**Figura 30.** Expresión de distintos ligandos Wnt no canónicos en DCs inmaduras y tras maduración con distintos estímulos. Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de ARNm de *Wnt11* y *Wnt4* en iDCs y maDCs estimuladas como se describe en la figura anterior. La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de *GAPDH* que fue utilizado como control endógeno. Los datos representan la media  $\pm$  SD de al menos 3 experimentos independientes. Nótese la diferencia en la escala respecto a la expresión de *Wnt5a* en la gráfica anterior.

#### 4.5.- Papel del Wnt5a producido por las DCs tras su estimulación

Puesto que nuestros datos señalaban que las DCs expresaban *Wnt5a*, y que la expresión de este gen se inducía notablemente tras estimulación con LPS, analizamos su papel durante la maduración y función de las DCs silenciando su transcripción mediante siRNA específicos. Para ello, llevamos a cabo, por nucleofección, la transfección de DCs con siRNAs pre-diseñados para el silenciamiento de *Wnt5a* (*Wnt5a*-siRNA DCs), usando como control negativo una mezcla de siRNAs irrelevantes (CTRL-siRNA DCs). Tres horas después de la nucleofección (tiempo que permite estabilizar la membrana de las células nucleofectadas) estimulamos las DCs con LPS durante 20 horas. Para recuperar la presencia de *Wnt5a* durante la maduración y la función de las DCs se añadió a los cultivos *Wnt5a* (*Wnt5a*-siRNA DCs + *Wnt5a*) (Esquema 7 en Material y Métodos).

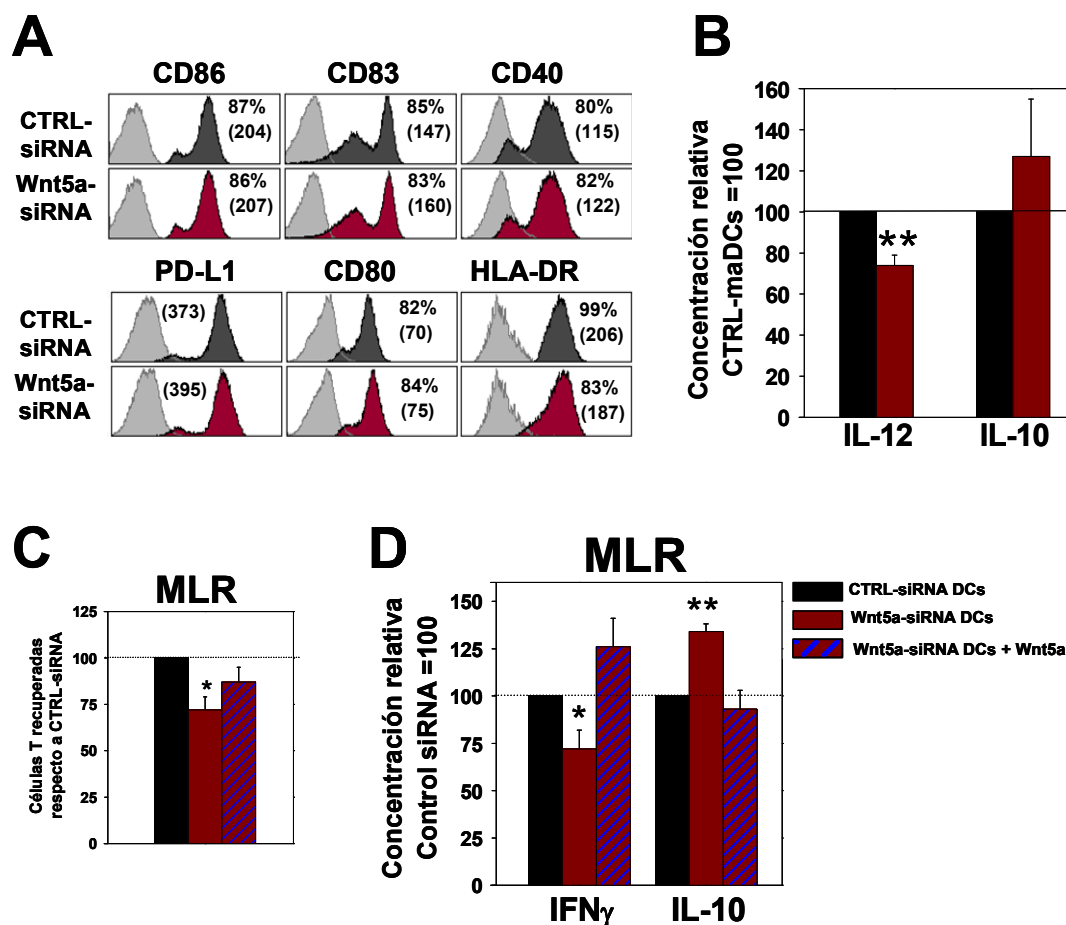
Se valoró la viabilidad de las células obtenidas mediante doble tinción con yoduro de propicio y Anexina V. Los experimentos en los que las células control no mostraban un aviabilidad adecuada (mayor del 70%) fueron descartados. Asimismo, mediante PCRq, llevamos a cabo la cuantificación del nivel de silenciamiento de la transcripción de *Wnt5a*. Como se observa en la Figura 32A obtuvimos un porcentaje de silenciamiento significativo, alrededor del 70%. Por tanto, aunque no podemos decir que hubiéramos alcanzado la eliminación total de *Wnt5a*, sí que conseguimos bloquear considerablemente la inducción de la expresión que se produce tras la estimulación.

En cuanto a los efectos de la reducción de la expresión de Wnt5a durante la maduración de las DCs, observamos un descenso ligero pero estadísticamente significativo del número de DCs recuperadas de los cultivos donde habíamos reducido la transcripción de Wnt5a, respecto a aquellos cultivos con células que habían sido transfectadas con el siRNA control. Esta reducción coincidía con un ligero aumento en el porcentaje de células apoptóticas (Fig. 31B).



**Figura 31. Efecto del silenciamiento de Wnt5a en la viabilidad de las iDCs.** DCs inmaduras fueron transfectadas mediante nucleofección con siRNA específicos para silenciar la expresión de Wnt5a (Wnt5a siRNA DCs) o con una mezcla de siRNAs irrelevantes (CTRL-siRNA DCs). Tres horas después de la transfección se añadió LPS (100 ng/ml) manteniéndose las células en cultivo otras 20 horas antes de su análisis (A) Porcentaje de silenciamiento tras la estimulación. La gráfica muestra los niveles relativos de ARNm para Wnt5a en las Wnt5a siRNA-DCs respecto a CTRL-siRNA DCs (barra negra, referido como 100%). (B) Porcentaje de células recuperadas respecto a la condición control (referida como 100%) y proporción de células apoptóticas (IP AnexV<sup>+</sup>) en un experimento representativo de al menos 4 experimentos independientes. Los datos de las gráficas de barras representan la media  $\pm$  SD de 5 a 7 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ .

El análisis por citometría de flujo indicó que durante la maduración de las DCs el Wnt5a autocrino no mediaba en la modulación de la expresión en membrana de las moléculas coestimuladoras e inhibitoras analizadas (Fig. 32A). Así, como ocurría tras la adición de Wnt5a a las DCs en maduración, las Wnt5a-siRNA DCs mostraron perfiles de expresión de HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86 y PD-L1 muy similares a los de sus controles individuales (Fig. 32A). En contraste, el silenciamiento de Wnt5a en las DCs sí redujo significativamente su capacidad para producir IL-12 (Fig. 32B). En cuanto a la producción de IL-10, ésta se incrementaba ligeramente aunque la variabilidad entre experimentos conducía a que estos cambios no fueran estadísticamente significativos (Fig. 32B).



**Figura 32. Efecto del silenciamiento de Wnt5a en la funcionalidad de las DCs.** DCs inmaduras fueron transfectadas para silenciar la expresión de Wnt5a según se describe en la figura anterior. (A) Análisis por citometría de flujo del fenotipo de las Wnt5a-siRNA DCs tras 20 horas de estímulo con LPS. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. (B) Niveles de IL-12 e IL-10 en los cultivos de siRNA-Wnt5a DCs respecto a sus controles individuales, siRNA-Control DCs (barra negra, referido como 100%). (C y D) Estas DCs fueron utilizadas para establecer cultivos de MLR con linfocitos T naive. Tras 6 días de cocultivo se analizó el porcentaje de células T recuperadas (C) y se midió la cantidad de IFN $\gamma$  e IL-10 en el sobrenadante de estos cultivos (D). Donde se indica, se añadió 100 ng/ml de Wnt5a a las DCs silenciadas en el momento del estímulo y estas células también fueron utilizadas para establecer cultivos de MLR. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 5 a 7 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.005$ .

El cultivo en MLR demostró que el silenciamiento de Wnt5a en las DCs afectaba negativamente a la capacidad aloestimuladora de las mismas. Este efecto negativo se veía reflejado a dos niveles. En primer lugar, el número de células T recuperadas de los MLR tras 6 días era entre un 20 y un 30% menor tras el silenciamiento de Wnt5a en las DCs que en sus controles (Fig.32C). En segundo lugar, y correlacionado con lo anterior, los niveles de IFN $\gamma$  se reducían significativamente mientras que los de IL-10 se incrementaban alrededor de un 40% (Fig.32D). Corroborando que este efecto se debía a la reducción en la expresión de Wnt5a en las DCs, la adición de esta proteína recuperó la capacidad aloestimuladora de las Wnt5a-siRNA DCs

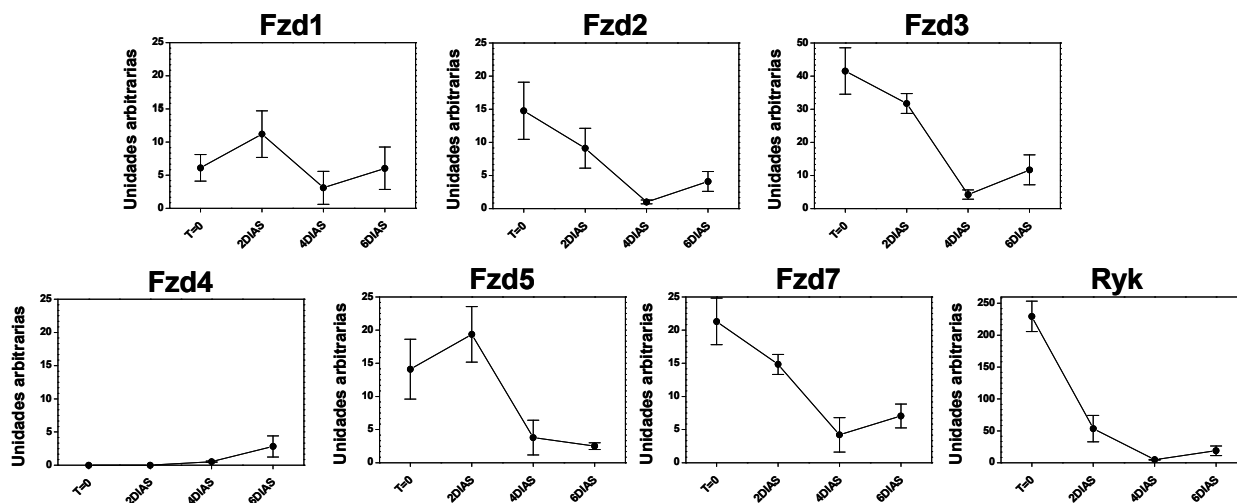
restaurando en los MLR la expansión de los linfocitos T y los niveles de IFN $\gamma$  e IL-10 (Fig. 32C y 32D).

#### **4.6 Los linfocitos T CD4 *naive* humanos expresan receptores para proteínas Wnt**

Según los resultados mostrados en el apartado anterior, la reducción en la producción de Wnt5a en las DCs estimuladas tenía un efecto autocrino sobre las DCs, reduciendo su viabilidad y alterando su capacidad para producir citocinas. Además observábamos un efecto negativo en su capacidad aloestimuladora. Esto último podría ser consecuencia directa de los cambios funcionales ocasionados en las Wnt5a-siRNA DCs pero también podría estar reflejando un papel paracrino del Wnt5a producido por las DCs sobre los linfocitos T CD4. Para esclarecer esta posibilidad nos planteamos estudiar el efecto de la adición de Wnt5a durante el proceso de activación vía CD3/CD28 de linfocitos T CD4 *naive* humanos.

Comenzamos este estudio analizando por PCRq la expresión de los receptores para ligandos Wnt Fzd1, Fzd2, Fzd3, Fzd4, Fzd5, Fzd7 y Ryk tanto en los linfocitos T CD4 *naive* como durante el transcurso de su activación. Como se observa en la Figura 33 los linfocitos T CD4 *naive* presentaban transcritos de todos los receptores analizados salvo de Fzd4. Exceptuando el receptor Ryk, los niveles de expresión fueron bajos tanto en la condición *naive* como durante su estimulación. Las cinéticas de expresión de los distintos receptores mostraban que Fzd1 y Fzd5 incrementaban ligeramente sus niveles en el día 2 de cultivo aunque posteriormente estos se reducían, como ocurría con el resto de los receptores analizados. Los niveles más bajos de transcrito de estos genes se observaban en el día 4 de cultivo, produciéndose, a continuación, un ligero incremento en la expresión de todos los receptores, exceptuando Fzd5, entre el día 4 y el día 6. Sin embargo, estos valores permanecían muy por debajo de los encontrados en las células T *naive* (Fig. 34).

En paralelo llevamos a cabo un estudio similar analizando los niveles de transcripción de los ligandos Wnt4, Wnt5a, y Wnt11. La expresión de estas moléculas, en todos los días analizados, fue indetectable o mínima (datos no mostrados).

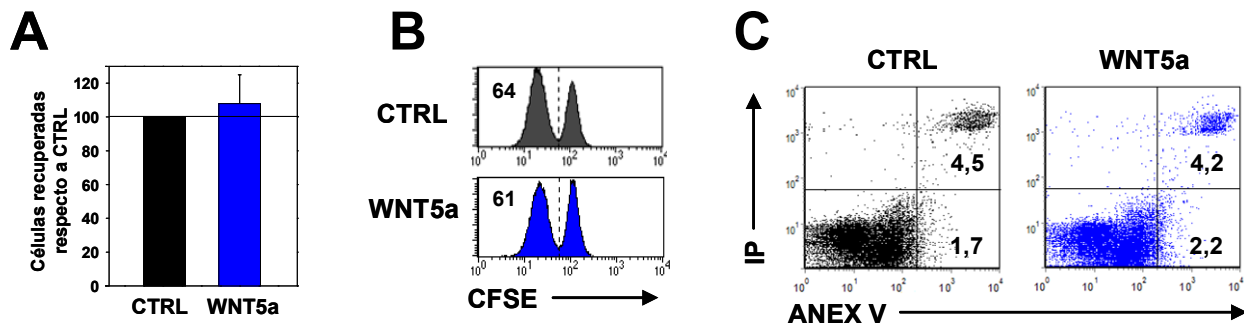


**Figura 33.** Expresión de receptores para ligandos Wnt antes y durante la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive humanos. Análisis por PCR cuantitativa de la cinética de expresión de diferentes receptores para proteínas Wnt en linfocitos T CD4 naive recién aislados (T=0) y tras su activación (2, 4 y 6 días) con anti-CD3 (10µg/ml) y anti-CD28 (4µg/ml). La variación entre muestras fue corregida normalizando contra la expresión de RPLP0 que fue utilizado como control endógeno. Los datos representan la media ± SD de 3 a 6 experimentos independientes.

#### 4.7 Wnt5a induce un incremento en la producción de IFN $\gamma$ durante la activación de linfocitos T CD4 naive

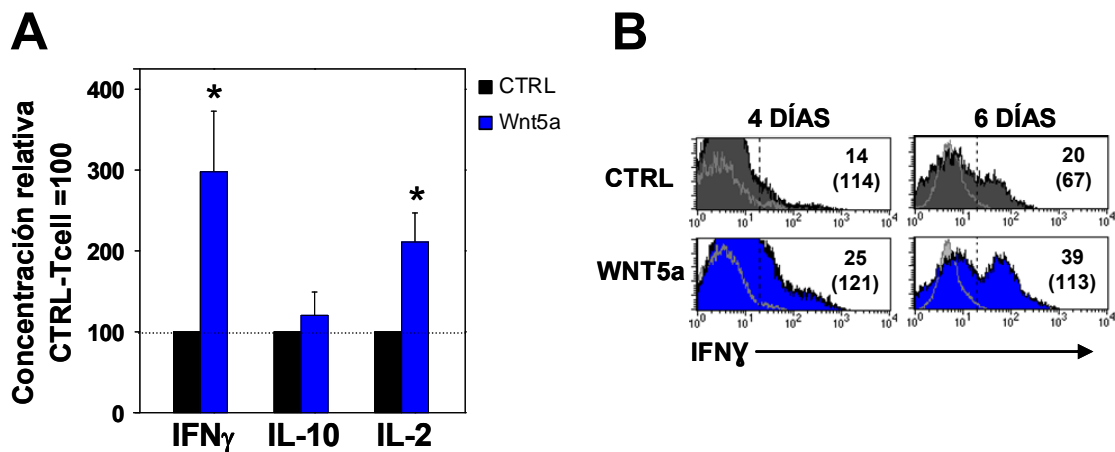
El estudio de la expresión de los receptores Wnt indicaba que los linfocitos T CD4 naive humanos podrían responder a Wnt5a. Por ello, continuamos nuestro estudio analizando el efecto de la adición de esta proteína durante la activación de estas células vía CD3/CD28.

Como se observa en la Figura 34, tras 6 días de cultivo el incremento de la señal Wnt5a no produjo cambios significativos en el número de células T recuperadas (Fig. 34A), lo que concordaba con los porcentajes similares de pérdida de tinción CFSE encontrados en células control y tratadas con Wnt5a (Fig. 34B). Asimismo tampoco observamos un efecto en la viabilidad celular (Fig. 34C).



**Figura 34:** La adición de *Wnt5a* durante la activación de linfocitos T  $CD4^+$  naive no modifica su expansión ni su viabilidad. Linfocitos T  $CD4$  naive aislados de sangre periférica fueron activados con anti-CD3 ( $10\mu\text{g/ml}$ ) y anti-CD28 ( $4\mu\text{g/ml}$ ) en presencia o ausencia de  $100\text{ ng/ml}$  de *Wnt5a*. En algunos experimentos las células fueron marcadas con CFSE. Tras 6 días de cultivo se determinó: (A) el número de células recuperadas respecto a la condición control (referida como 100%). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 8 experimentos independientes; (B) el porcentaje de células con más de 1 ciclo de división, usamos células T cultivadas en ausencia de anti-CD3 y anti-CD28 como control negativo; (C) el porcentaje de células apoptóticas (IP<sup>+</sup> ANEX V<sup>+</sup>) en ambos cultivos. Los datos de (B) y (C) son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

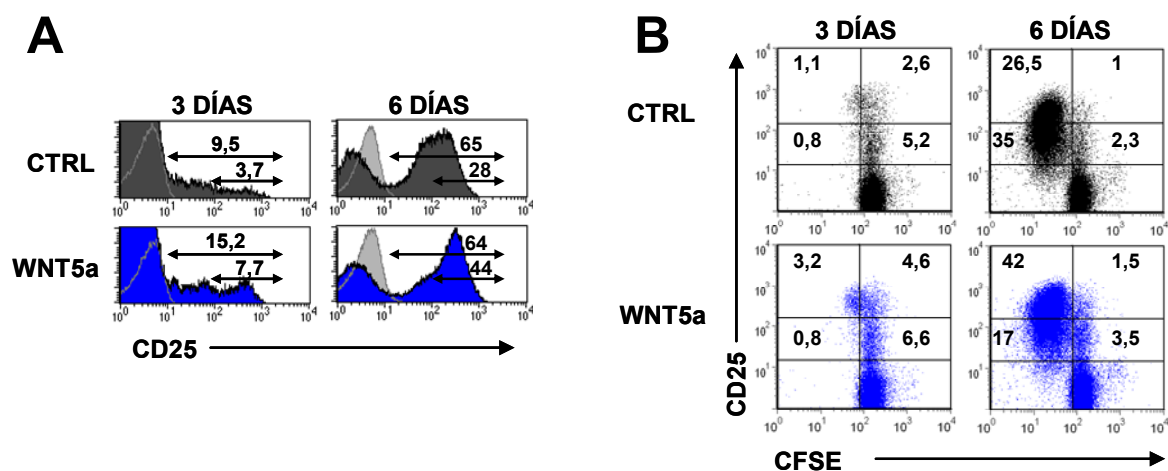
En contraste, cuando analizamos el efecto de *Wnt5a* en la producción de citocinas por parte de los linfocitos T observamos que este tratamiento inducía un importante incremento en los niveles de IFN $\gamma$  detectados en los sobrenadantes tras 6 días de cultivo (Fig. 35A). Así, encontramos de media tres veces más cantidad de IFN $\gamma$  en los sobrenadantes de los linfocitos T tratados con *Wnt5a*, respecto a los linfocitos T control. Este incremento en los niveles de IFN $\gamma$  en los sobrenadantes se correlacionaba con un mayor porcentaje de células productoras de IFN $\gamma$  a los 6 días de cultivo (Fig. 35B). Además, este análisis por citometría de flujo puso de manifiesto que el efecto de *Wnt5a* sobre la producción de IFN $\gamma$  ya era detectable a los 4 días de cultivo, y que, tanto en el día 4 como en el día 6, las células IFN $\gamma^+$  presentaban mayores niveles de expresión de esta proteína (Fig. 35B). Además de la cantidad de IFN $\gamma$ , medimos los niveles de otras citocinas como IL-10 e IL-2. En el caso de la IL-10 no encontramos que *Wnt5a* indujera diferencias significativas en sus niveles respecto a los cultivos control (Fig. 35A). Por el contrario, como consecuencia del tratamiento con *Wnt5a*, los niveles de IL-2 se duplicaban a los 6 días de cultivo (Fig. 35A), un efecto que ya era evidente a los 4 días de cultivo (datos no mostrados).



**Figura 35.** Wnt5a induce un incremento en la producción de IFN $\gamma$  durante la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive. Linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive fueron cultivados como se explica en la Figura 34. (A) Determinación tras 6 días de cultivo de los niveles de distintas citocinas en los sobrenadantes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive tratados con Wnt5a respecto a los cultivos control (referido como 100%). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 4 a 7 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$ . (B) Expresión intracelular de IFN $\gamma$  analizada por citometría de flujo en linfocitos T CD4<sup>+</sup> naive activados, tras 4 y 6 días de cultivo, en presencia o no de Wnt5a. El porcentaje de células positivas, determinado de acuerdo al control negativo (histograma en gris), y la IMF (en paréntesis) se muestra en cada histograma. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes.

Puesto que la respuesta a IL-2, la producción de IFN $\gamma$  y la proliferación de los linfocitos T están íntimamente relacionadas, a continuación analizamos los niveles de CD25 y de pérdida de CFSE en los cultivos a 3 días, momento en el que comienza a ser evidente el inicio de la expresión de esta molécula y la proliferación. Como se observa en la Figura 36, en este momento del cultivo alrededor de un 9% de células control eran CD25<sup>+</sup>, y menos del 4% eran CD25<sup>high</sup>. En los cultivos que se habían estimulado en presencia de Wnt5a, encontrábamos una proporción significativamente mayor de linfocitos que expresaban CD25 y el porcentaje de células CD25<sup>high</sup> duplicaba al de los controles (Fig. 36A).

Mediante el método de dilución de CFSE pudimos analizar la tasa proliferativa de estas células. Así, a los 3 días de cultivo, observamos que en la condición control sólo una proporción muy pequeña de células había comenzado a proliferar, y que esta población se caracterizaba por expresar altos niveles de CD25 (Fig. 36B). Sin embargo, en los cultivos tratados con Wnt5a aunque el porcentaje de células que habían iniciado la proliferación también era pequeño, éste era mucho mayor que el observado en los cultivos control, al igual que ocurría con la proporción de células CD25<sup>high</sup> (Fig. 36B). Por otra parte, a los 6 días de cultivo ya no se observaba un incremento en la proporción de células que habían proliferado en los cultivos tratados respecto a los controles, que se correspondía con el porcentaje de células CD25<sup>+</sup>. Sin embargo, la intensidad de expresión de CD25 seguía siendo significativamente mayor en los linfocitos T tratados con Wnt5a (Fig. 36A y 36B).



**Figura 36. Análisis de la proliferación y la expresión de CD25 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados en presencia de Wnt5a.** Linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve fueron cultivados como se explica en la Figura 34. Las células recuperadas tras 3 y 6 días de cultivo fueron marcadas con un anticuerpo específico para CD25. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD25. Se muestra el porcentaje de células CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>high</sup>. (B) Los diagramas de puntos muestran la expresión de CD25 respecto a la pérdida de tinción de CFSE. Los datos mostrados son representativos de 4 experimentos independientes.

En conjunto estos resultados sugerían que Wnt5a producido por las DCs maduras podría participar durante el proceso de estimulación de los linfocitos T CD4 naïve favoreciendo la producción de citocinas pro-Th1.

## **DISCUSIÓN**

Las DCs juegan un papel clave, gracias a su plasticidad, tanto en el inicio de una respuesta inmunogénica como en la consecución de la tolerancia. Numerosos estudios centran su atención en esclarecer qué mecanismos regulan tanto la diferenciación como la función de estas células con el fin de poder modular estos procesos. Nuestro trabajo demuestra que Wnt5a sería una de estas moléculas moduladoras que jugaría un papel dual durante la diferenciación y maduración de las moDCs.

A la vista de nuestros resultados tanto los monocitos como las moDCs expresan receptores para ligandos Wnt, y sus niveles se modifican a lo largo de su ciclo de vida. La activación de la señalización Wnt es capaz de modular la diferenciación de las moDCs humanas, así como su posterior maduración y función. El incremento en la señalización Wnt no canónica mediada por Wnt5a interfiere en la diferenciación de las moDCs humanas, dando lugar a células con características propias de DCs tolerogénicas. En contraste, el incremento de la señal Wnt5a en las DCs antes o durante su maduración produce un efecto opuesto aunque menos significativo. Este menor impacto de la adición de Wnt5a parece estar relacionado con el hecho de que las DCs inmaduras producen Wnt5a y su producción se incrementa notablemente tras su maduración. El Wnt5a producido por las DCs es necesario tanto para su correcta maduración como para su función aloestimuladora de linfocitos T y la inducción de una respuesta Th1.

La consecuencia final de la señalización Wnt va a estar determinada no sólo por el ligando Wnt que la desencadena, sino también, por el repertorio de receptores y moléculas transductoras de señal que exprese la célula diana (*van Amerongen 2012*). Las variaciones en el panel de receptores para proteínas Wnt que observamos a lo largo del ciclo vital de las moDCs denotan no sólo una diferente sensibilidad o respuesta a estos ligandos, sino que los propios acontecimientos que tienen lugar durante este proceso inciden sobre la expresión de estos receptores sugiriendo una función para la señal Wnt.

En un trabajo anterior Tickenbrock y colaboradores (2006) demostraron que los monocitos expresan Fzd1, Fzd5 y Fzd7 y en menor medida Fzd4 y Fzd8 (*Tickenbrock y col. 2006*). Nuestro análisis mediante PCRq pone de manifiesto que los monocitos expresan niveles detectables, pero bajos, de todos receptores Wnt analizados, Fzd1, Fzd2, Fzd3, Fzd4, Fzd5, Fzd7, Ryk, ROR1 y ROR2. No obstante, la expresión de la mayor parte de ellos se incrementa durante las primeras horas de cultivo con GM-CSF/IL-4, es decir, durante los primeros momentos del proceso de diferenciación de las DCs, sugiriendo que la señalización Wnt puede jugar un papel importante en este periodo. De entre los receptores que sufren un mayor

incremento en su expresión durante este espacio de tiempo destaca Fzd5. La expresión de Fzd5 se ha descrito en macrófagos (*Blumenthal y col. 2006; Pereira y col. 2008; Maiti y col. 2012*) y sinoviocitos (*Sen y col. 2001*), actuando como receptor de Wnt5a, y asociando esta señalización a procesos inflamatorios. Otros receptores como Fzd2 y Fzd7 también aumentan significativamente su expresión durante este periodo. El incremento en la expresión de Fzd2 durante la diferenciación de las DCs ya fue descrita por Lehtonen y colaboradores (2007) quienes sugieren, pero no demuestran, que mediaría la señalización de Wnt5a activando la ruta dependiente de  $Ca^{+2}$  (*Lehtonen y col. 2007*). Fzd7, por su parte, forma un complejo con ROR2 a través del cual puede señalizar Wnt5a activando la ruta PCP en fibroblastos (*Nishita y col. 2010*). Por lo tanto, parece fácil pensar que Wnt5a estaría señalizando a través de uno o varios de estos receptores durante los primeros momentos de la diferenciación de las moDCs.

Es en la población de DCs inmaduras en la que encontramos una mayor diversidad de receptores. Mientras que la expresión de Fzd5 se reduce drásticamente tras las primeras horas de cultivo, los niveles de transcritos de Fzd2 y Fzd7, aunque disminuyen, se mantienen elevados en las DCs inmaduras. Sin embargo, el receptor más expresado en estas células es Fzd1. Este receptor media la señal de Wnt3a resultando en la activación de la ruta dependiente de  $\beta$ -catenina tanto en ratón (*Neumann y col. 2010*) como en células humanas (*Gazit y col. 1999*). Pero además, es en este momento del ciclo de vida de las moDCs donde encontramos mayores niveles de transcritos de Fzd3 y de los receptores no convencionales estudiados, Ryk, ROR1 y ROR2. Se ha demostrado que Fzd3 puede actuar como receptor de Wnt5a en fibroblastos de la dermis humana en los que activaría la ruta PI3K/Akt promoviendo la adhesión mediada por integrinas (*Kawasaki y col. 2007*).

Dentro de los receptores no convencionales analizados, sólo Ryk es expresado tanto en los monocitos como a lo largo del proceso de diferenciación de las DCs. Varios trabajos han demostrado que Wnt5a señala a través de Ryk en diferentes tejidos (*Lu y col. 2004; Keeble y col. 2006*) pero, hasta el momento, ningún estudio ha abordado su papel en el sistema inmune y hematopoyético. Nosotros detectamos Ryk tanto en las DCs como en los linfocitos T CD4 *naive*, en los que es el receptor Wnt que presenta mayores niveles de transcritos. La señalización mediada por Ryk puede tanto activar la ruta Wnt canónica uniéndose a Wnt1 y Wnt3a (*Lu y col. 2004*), como desencadenar distintas rutas Wnt no canónicas tras su unión a Wnt5a o Wnt11 (*Kim y col. 2008; Andre y col. 2012; Hutchins y col. 2012*). Ryk puede utilizar tres mecanismos para transducir la señal Wnt. Por un lado puede activar la ruta Wnt canónica, como hemos comentado anteriormente. Por otro lado puede reclutar proteínas efectoras catalíticamente activas interactuando con quinasas de la familia Src (*Wouda y col. 2008*). Y por último, Ryk puede

utilizar un sistema de señalización que recuerda a la vía Notch. Tras la unión del ligando Wnt, Ryk es cortado proteolíticamente gracias a la acción de la  $\gamma$ -secretasa y su dominio intracelular se dirige al núcleo donde activa la transcripción de genes involucrados en la diferenciación neuronal (Fradkin y col. 2010).

Asimismo, los receptores no convencionales ROR1 y ROR2 deben jugar un papel en las DCs inmaduras, puesto que su expresión es prácticamente indetectable a lo largo del proceso de diferenciación, y sólo se incrementa en estas células. ROR2 actúa como co-receptor de la señal Wnt y se ha demostrado que forma un complejo ternario junto con Wnt y diferentes receptores Fzd (Fzd5, Fzd6 o Fzd7) (Yamamoto y col. 2008; Nishita y col. 2010). ROR2 media la señal de Wnt5a activando la ruta no canónica PCP que conlleva la activación de JNK (Oishi y col. 2003) e inhibe la señalización Wnt canónica (Mikels y Nusse 2006). Por otra parte, ROR1 también actúa como receptor de Wnt5a, aunque su función ha sido mucho menos estudiada (Fukuda y col. 2008; Grumolato y col. 2010).

El proceso de maduración en respuesta a LPS también modifica la expresión de los diferentes receptores para proteínas Wnt estudiados. A diferencia de lo que cabría esperar dado el papel en inflamación que se ha descrito para Fzd5 en macrófagos, este receptor no modifica su expresión tras la estimulación de las DCs y se mantiene bajo en las DC maduras. Otros receptores como Fzd2, Fzd3, Fzd7 y los dos receptores ROR ven reducida su expresión tras la maduración en respuesta a este estímulo. Algo similar ocurre con la transcripción de Ryk aunque éste recupera parcialmente su expresión a las 48 horas.

Los receptores Fzd4 y Fzd1 presentan una cinética de regulación distinta tras la estimulación vía TLR4. En el caso de Fzd4, tras 3 horas de estímulo encontramos un drástico incremento de su expresión, volviendo a reducirse a niveles muy bajos en las horas posteriores. Esto sugiere que la señalización a través de Fzd4 sólo se produciría en este corto periodo de tiempo. Se ha descrito que Wnt5a puede activar la ruta Wnt canónica a través de Fzd4 y LPR5 (Mikels y Nusse 2006; Pukrop y Binder 2008). Bansal y colaboradores (2011) han descrito un papel clave de la señalización de Wnt5a mediada por Fzd4 en la infección por *Mycobacterium bovis* (Bansal y col. 2011). En macrófagos de ratón infectados con este patógeno, se induce la expresión de Wnt5a y Fzd4. En estas células, Fzd4 media la señalización dependiente de  $\beta$ -catenina iniciada por Wnt5, que induce la activación de la señalización Notch1 promoviéndose, en última instancia, la transcripción de sus genes diana COX2 y SOSC3, proteínas asociadas con una respuesta inmune reguladora. De hecho, estos autores demuestran que bajo estas circunstancias se produce un aumento en el porcentaje de linfocitos Treg (Bansal y col. 2011).

De acuerdo con lo anterior, parece que esta bacteria utilizaría la inducción de Fzd4 y Wnt5a en estas células como mecanismo para eludir la respuesta inmune.

La expresión de Fzd1, como hemos comentado anteriormente, es elevada en la DCs inmaduras pero se reduce notablemente durante las primeras horas de estímulo con LPS. No obstante, esta reducción es transitoria ya que a las 48 horas se observan los niveles más altos de Fzd1, superando los detectados en las DC inmaduras. En relación con estos resultados, como comentaremos después, se ha descrito que la expresión de Fzd1 en macrófagos de ratón se induce notablemente, de forma secundaria a la producción de TNF $\alpha$ , tras activación con diferentes estímulos bacterianos (*Neumann y col. 2010*).

El proceso de maduración inducido por los distintos estímulos estudiados modifica de forma diferencial la expresión de los receptores de ligandos Wnt. Puesto que la cascada de señalización que desencadena un estímulo TLR va a determinar, al menos en parte, la capacidad funcional de las DCs, no parece extraño que cada estímulo TLR induzca de manera diferencial la expresión de los distintos receptores de proteínas Wnt. Los tres estímulos TLR analizados, tras 24 horas, sólo inducen el mismo efecto en el caso de la expresión de Fzd3, Ryk y ROR1, cuya transcripción se reduce drásticamente en todos los casos.

Sin embargo, mientras que las DCs estimuladas con LPS y Poly I:C presentan niveles menores o iguales de Fzd2, Fzd7, Fzd1 y Fzd5 que las iDCs, el ligando de TLR8 induce un fuerte incremento en la expresión de estos receptores, llegando a multiplicarse por factores de 3 y 4 en el caso de Fzd1 y Fzd5, respectivamente. Respecto a la expresión de Fzd4 y ROR2, la estimulación con Poly I:C promueve un incremento importante en la transcripción de estos receptores mientras que los otros dos ligandos TLR estudiados apenas modifican la expresión de los mismos respecto a las iDCs. Sin embargo, quedaría por esclarecer el significado funcional de esta regulación diferencial de los receptores Wnt en las DCs maduras y, por ende, su diferente sensibilidad a las señales Wnt.

Una situación similar se ha descrito en macrófagos y se ha asociado con procesos donde esta población adquiere un perfil funcionalmente distinto. Así, la infección de macrófagos por *Mycobacterium bovis* BCG induce, vía TLR2, la expresión de Fzd4 (*Bansal y col. 2011*). En este contexto, Wnt5a-Fzd4 promueve la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina que induce una respuesta inmune reguladora (*Bansal y col. 2011*). Por su parte, la activación de los macrófagos por *Mycobacterium tuberculosis*, que implica tanto a TLR2 como a TLR4, induce inicialmente la expresión de Fzd5 (*Blumenthal y col. 2006*). Esta situación promueve la señalización no canónica mediada por Wnt5a-Fzd5 que provoca un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 y TNF $\alpha$ , que induce un incremento en la respuesta Th1 (*Blumenthal y*

*col. 2006; Schaale y col. 2011*). Posteriormente, en respuesta a TNF $\alpha$ , se promueve la transcripción de Fzd1 que media la señalización Wnt canónica iniciada por Wnt3a. La activación de esta ruta inhibe la producción de TNF $\alpha$  en estas células que adquieren características propias de macrófagos M2, controlando así que no se produzca una respuesta inflamatoria continuada (*Neumann y col. 2010; Schaale y col. 2011*).

A la vista de nuestros resultados no podemos aventurarnos a concretar a través de qué receptor estarían señalizando preferencialmente las proteínas Wnt ni en el proceso de diferenciación de los monocitos humanos hacia DCs ni en su posterior maduración. No obstante, es importante destacar que la señalización Wnt debe jugar un papel importante puesto que la expresión de sus receptores se modifica sustancialmente a lo largo de todo el proceso. De hecho, y parte de lo argumentado anteriormente, la actividad GSK3 es crucial para la diferenciación de los monocitos en DCs, evitando su desviación hacia linaje macrófago (*Rodionova y col. 2007*). Es más, el cultivo de monocitos induce un incremento inicial en la estabilización de  $\beta$ -catenina, probablemente inducida por el proceso de adhesión (*Thiele y col. 2001*), aunque después, presumiblemente en respuesta a las señales que tienen lugar durante el proceso de diferenciación de las DCs, los niveles de  $\beta$ -catenina disminuyen.

Con el fin de analizar el efecto de la activación de la señalización Wnt en la diferenciación de los monocitos hacia DCs, llevamos a cabo cultivos de diferenciación de estas células donde adicionamos Wnt3a o Wnt5a, ligandos típicamente considerados canónico y no canónico, respectivamente. Nuestros resultados muestran que un incremento en la señalización Wnt durante la diferenciación de los monocitos humanos en DCs interfiere, pero no inhibe, en dicha diferenciación. Así las Wnt-DCs obtenidas en estos cultivos presentan alterado tanto su fenotipo como su capacidad para captar antígenos. Estas alteraciones se ven reflejadas en una menor capacidad para madurar en respuesta a estímulos TLR lo que se traduce en importantes cambios en su capacidad funcional.

En todos los aspectos estudiados las Wnt5a-DCs estaban más afectadas que las Wnt3a-DCs. Como hemos comentado anteriormente, durante las primeras horas de la diferenciación de las DCs los receptores que más se expresan son Fzd2, Fzd5 y Fzd7, receptores que han sido ampliamente descritos como mediadores de la señal de Wnt5a (*Sen y col. 2001; Blumenthal y col. 2006; Pereira y col. 2008; Nishita y col. 2010; Sato y col. 2010; Maiti y col. 2012*). Esto nos sugiere que, en estas células, Wnt5a podría señalizar más eficientemente que Wnt3a lo que explicaría, al menos en parte, la diferencia en los efectos observados tras ambos tratamientos. De

hecho, como discutiremos posteriormente, las rutas de señalización de las que depende el efecto de Wnt5a sobre la diferenciación de las DCs son no canónicas.

Las DCs juegan un papel dual dirigiendo la respuesta inmune mediada por las células T. Dependiendo de su capacidad funcional, las DCs pueden estimular o suprimir un respuesta inmune. Su capacidad para adquirir características inmunoestimuladoras en respuesta a un estímulo exógeno, como ligandos TLR, es crucial para mediar la integración entre la respuesta innata y adaptativa contra patógenos, porque las DCs inmaduras o parcialmente maduras pueden ejercer un efecto tolerogénico o inmunosupresor.

Las DCs generadas en presencia de Wnt5a tienen numerosas características comunes con las DCs tolerogénicas generadas *in vitro*, puesto que no maduran correctamente en respuesta a estímulos TLR y se caracterizan por secretar bajos niveles de IL-12 y un incremento en la producción de IL-10 (*Chamorro y col. 2009; Torres-Aguilar y col. 2010*). A esta lista de cualidades comunes podemos añadir que las Wnt5a-DCs también presentan una mayor capacidad de captar antígenos por endocitosis y una reducción en la expresión de HLA-DR y moléculas coestimuladoras, tanto en su estado inmaduro como tras estimulación con los distintos ligandos TLR (*Sato y col. 2002; Torres-Aguilar y col. 2010*).

La menor capacidad de respuesta de las Wnt5a-DCs a la estimulación vía TLR podría ser la base de parte de sus defectos funcionales. Las Wnt5a-DCs muestran menor expresión de TLR3, TLR4 y TLR5 que las CTRL-DCs, lo que explicaría, al menos en parte, la respuesta inadecuada de estas células a Poly I:C, LPS y Flagelina, respectivamente. Sin embargo encontramos niveles normales o incluso mayores de TLR1, TLR2, TLR6 y TLR8, aunque la respuesta de las Wnt5a-DCs a Pam3CSK4, FSL1 y ssRNA40 también está afectada. Estos resultados sugieren que otros mecanismos independientes de la expresión de TLR van a determinar también las características funcionales de las Wnt5a-DCs.

El análisis por PCR cuantitativa de diferentes factores de transcripción y proteínas reguladoras implicadas en la maduración y función de las DCs revela que las Wnt5a-DCs presentan alterado el patrón de expresión de algunos de ellos, lo que podría ser otro factor que subyaciera a los cambios fenotípicos y funcionales observados en las Wnt5a-DCs.

Es bien conocido que diferentes miembros de la familia IRF juegan un papel crucial en la diferenciación y activación de las DCs (*Gabriele y Ozato 2007*). Dentro de esta familia de factores de transcripción cabe destacar IRF-1 e IRF-8 puesto que regulan positivamente la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias como IL-12 (*Liu y col. 2005*). Nuestro estudio revela que las Wnt5a-DCs no incrementan la expresión de estos factores tras estimulación con LPS como lo hacen las CTRL-DCs, si no que presentan niveles incluso menores tanto de ARNm

como de proteína. Por lo tanto, esta modificación en la expresión de IRF1 e IRF8 podría ser una de las causas de la disminución observada en la producción de IL-12 por parte de las Wnt5a-DCs.

La familia de proteínas ID está involucrada en la diferenciación de muchos tipos celulares, incluyendo las DCs (*Hacker y col. 2003*). Nuestros resultados muestran una importante reducción en la expresión de ID2 en las Wnt5a-DCs respecto a las CTRL-DCs, característica que se ha descrito en DCs tolerogénicas (*Torres-Aguilar y col. 2010*), aunque el significado de esta alteración está por esclarecer. En contraste, la expresión de ID3 a nivel de transcrito se triplica en las Wnt5a-DCs respecto a los CTRL-DCs. A tenor de lo descrito en la bibliografía (*Gratchev y col. 2008; Kuo y col. 2011*), el incremento que observamos en la expresión de ID3 en las Wnt5a-DCs puede explicar, al menos en parte, los elevados niveles de IL-10 detectados en los sobrenadantes tras la estimulación de estas células, y viceversa. Así, la sobreexpresión de ID3 en monocitos se ha asociado a un incremento en la producción de IL-10, mientras que la respuesta a IL-10, a su vez, induce la expresión de ID3, estableciéndose un ciclo de retroalimentación positiva en la regulación de estos dos genes (*Kuo y col. 2011*). Además este mismo trabajo muestra que las DCs presentes en cáncer de pulmón expresan niveles elevados de IL-10, efecto mediado por la inducción de ID3, impidiendo una respuesta adecuada de las células T (*Kuo y col. 2011*). También se ha encontrado esta asociación entre ID3 e IL-10 en macrófagos, de manera que una elevada expresión de ID3 es característica de macrófagos M2 activados con TGF $\beta$  e IL-4 que expresan niveles elevados de IL-10 (*Gratchev y col. 2008*).

La elevada expresión de SOCS3 observada en las Wnt5a-DCs también puede interferir con el proceso de maduración de las mismas. Las proteínas SOCS son importantes moduladores de la activación de las DCs ya que regulan negativamente tanto la señalización a través de TLR como la transducción de señales iniciadas por citocinas y mediada por el complejo de proteínas JAK-Stat (*Dimitriou y col. 2008*). Análogamente a nuestros resultados, DCs que sobreexpresan SOCS3 secretan pequeñas cantidades de IL-12 pero altos niveles de IL-10, exhibiendo características tolerogénicas (*Li y col. 2006*). Además se ha demostrado que la expresión de SOCS3 es inducida por diferentes citocinas, como IL-6 e IL-10 (*Dimitriou y col. 2008*), citocinas que, como demuestran nuestros resultados, se incrementan durante la diferenciación de las DCs en presencia de Wnt5a.

Uno de los mecanismos por los cuales Wnt5a interfiere en la diferenciación de las moDCs es afectando directamente a la señalización GM-CSF/IL-4 en los monocitos. El resultado de la diferenciación *in vitro* de los monocitos hacia DCs depende en última instancia de lo eficiente que sea la señalización GM-CSF/IL-4 (*Conti y Gessani 2008; Zhan y col. 2012*). La

transducción de esta señal está mediada por las proteínas STAT5 y STAT6, respectivamente (*Maier y col. 2012; van de Laar y col. 2012*). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con proteínas Wnt inhibe, de forma parcial pero significativa, la fosforilación de STAT5 y STAT6 inducida por GM-CSF e IL-4 en monocitos durante las primeras horas de cultivo. En relación con estos resultados, encontramos también un incremento en los niveles de SOCS3 en las primeras horas de cultivo con Wnt5a, lo que podría explicar la inhibición de la fosforilación de las proteínas STAT puesto que las proteínas SOCS pueden interferir en la activación de estas proteínas, mediante la inhibición de la activación de proteínas JAK (*Croker y col. 2008*).

La señalización GM-CSF/IL-4 induce importantes cambios en la expresión de diversos factores de transcripción y proteínas reguladoras necesarias para la diferenciación y posterior función de las DCs (*Gabriele y Ozato 2007; Belz y Nutt 2012*). De acuerdo con el efecto modulador pero no inhibidor de Wnt5a en la diferenciación de las DCs, observamos una regulación normal de la mayor parte de los genes durante las primeras horas de cultivo de los monocitos tratados con Wnt5a. No obstante, a las 20 horas de cultivo Wnt5a reduce significativamente la expresión de PU.1, factor de transcripción que ejerce una función decisiva en la diferenciación de DCs a partir de monocitos, puesto que cuando se sobreexpresa se induce la diferenciación de DCs, reprimiéndose, a su vez, el desarrollo de macrófagos (*Zenke y Hieronymus 2006*). Asimismo encontramos una reducción muy importante en los niveles de IRF3 e IRF8, factores cruciales en el desarrollo y función de las DCs (*Gabriele y Ozato 2007*), que en el caso de IRF8 se mantenían disminuidos a los 6 días de cultivo. Otra proteína clave en el desarrollo de las DCs, ID2 (*Rankin y Belz 2011*), sufría importantes modificaciones en su expresión a las 3 horas en los cultivos tratados con Wnt5a respecto a los cultivos control.

De acuerdo con lo comentado hasta el momento, Wnt5a actuaría durante las primeras horas del cultivo induciendo cambios fundamentales en el proceso de diferenciación. De hecho el tratamiento con Wnt5a restringido a las primeras 24 horas tiene un efecto irreversible en el fenotipo y la función de las DCs. En contraste, Bergenfelz y colaboradores (2012) muestran que es necesario el tratamiento con Wnt5a a lo largo del cultivo de diferenciación de los monocitos en macrófagos para obtener el bloqueo en la diferenciación M1 (*Bergenfelz y col. 2012*). Asimismo, para la producción de DCs tolerogénicas *in vitro* es necesario el tratamiento continuado de las células en diferenciación con las citocinas inmunosupresoras (*Torres-Aguilar y col. 2010*).

Además del efecto negativo de Wnt5a sobre la señalización GM-CSF/IL-4, nuestro estudio muestra que la adición de Wnt5a a los monocitos en diferenciación les induce a secretar grandes cantidades de IL-6 e IL-10 durante las primeras horas de cultivo, lo que favorecería la

generación de DCs tolerogénicas (Sato y col. 2002; Torres-Aguilar y col. 2010). Las altas concentraciones de IL-6 encontradas en los sobrenadantes de los cultivos de monocitos tratados con Wnt5a podrían dirigir la diferenciación de los mismos hacia macrófagos (Chomarat y col. 2000). Sin embargo, en estos mismos sobrenadantes encontramos un aumento de los niveles de TNF $\alpha$  respecto a los cultivos control, lo que contrarrestaría el efecto de IL-6 redirigiendo la diferenciación de los monocitos hacia DCs (Chomarat y col. 2003). Por lo tanto, los cambios en los niveles de citocinas que induce Wnt5a durante las primeras horas de cultivo de los monocitos con GM-CSF/IL-4 permiten su diferenciación hacia DCs y no hacia linaje macrófago, a la vez que promueve la generación de DCs con características tolerogénicas.

Trabajos recientes han puesto de manifiesto que diferentes componentes de la señalización Wnt juegan un papel importante durante la diferenciación de las DCs determinando sus características funcionales. Sin embargo, en la mayor parte de estos trabajos no se analiza la respuesta a los ligandos Wnt, sino modificaciones en distintos componentes de la ruta. No obstante, la participación de la señalización Wnt en este proceso parece compleja y dependiente del estado de desarrollo y linaje de las DCs del que se trate.

Resultados previos de nuestro grupo demostraban que la estabilización transitoria de  $\beta$ -catenina, mediante tratamiento con LiCl o Wnt3a, reduce la capacidad de los precursores tímicos humanos para diferenciar hacia DCs (Valencia y col. 2010), revelando, por tanto, un efecto negativo de la señalización Wnt canónica en la diferenciación de las DCs a partir de progenitores tímicos. En contraste, y apoyando un efecto positivo de la señalización Wnt canónica en la diferenciación y función de las DCs, Zhou y colaboradores (2009) demostraron que la adición de Wnt3a o la inhibición de GSK3 incrementa la proporción de DCs recuperadas de cultivos de células progenitoras hematopoyéticas, así como su capacidad aloestimuladora, mientras que la delección de  $\beta$ -catenina tiene el efecto contrario (Zhou y col. 2009). En este mismo sentido, la activación de la señalización Wnt canónica durante el desarrollo de células de Langerhans a partir de progenitores de médula ósea de ratón incrementa su producción *in vitro*, mientras que el bloqueo de dicha señal *in vivo* tiene el efecto contrario (Becker y col. 2011).

En nuestros cultivos, Wnt5a no incrementa los niveles de  $\beta$ -catenina por encima de los valores de las células control, sino que por el contrario induce un ligero descenso de los mismos. Previamente, ya se ha demostrado en diferentes trabajos que Wnt5a tiene la capacidad de inhibir la ruta Wnt canónica y promover la degradación de  $\beta$ -catenina de forma independiente a la actividad de GSK3 en fibroblastos, progenitores hematopoyéticos y células cancerígenas (Topol y col. 2003; Nemeth y col. 2007). Este resultado nos sugería que los efectos de Wnt5a sobre la

diferenciación de las DCs no eran ocasionados por la activación de la ruta canónica. Así la inhibición de GSK3 y subsiguiente estabilización de  $\beta$ -catenina producida por la adición de LiCl no mimetiza los efectos de Wnt5a. Por un lado, no observamos la fuerte inducción producida por Wnt5a en los niveles de IL-6, IL-10 y TNF $\alpha$  durante las primeras 24 horas de cultivo, y por otro, encontramos notables diferencias tanto en el fenotipo de las DCs producidas en presencia de LiCl, como en su capacidad para producir citocinas en respuesta a LPS, respecto a las Wnt5a-DCs. En relación con estos resultados, el fenotipo de las LiCl-DCs obtenidas en nuestros cultivos concuerda con lo observado por Rodionova y colaboradores (2007), que propusieron que la actividad de GSK3 es necesaria para la diferenciación de los monocitos en DCs, puesto que la inhibición de esta enzima bloquea la diferenciación de los monocitos hacia DCs, dando lugar a células de tipo macrófago que producen menos IL-12 y más IL-10 en respuesta a *E coli*. (Rodionova y col. 2007). Contradiendo en parte estos resultados, y los nuestros, en un trabajo posterior Liu y colaboradores (2011) mostraron que tras inhibir GSK3 durante la diferenciación de monocitos hacia DCs se obtienen células CD14<sup>-</sup> con mayor expresión de CD86 y capacidad para producir IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ , aunque igualmente incapaces de producir IL-12 (Liu y col. 2011).

Apoyando la idea de que Wnt5a actúa a través de la activación de rutas no canónicas, en nuestros cultivos los monocitos responden a Wnt5a activando CaMKII, aumentando los niveles de fosforilación de esta quinasa de forma dosis dependiente. Es más, el efecto de Wnt5a en estas células es dependiente, en parte, de la actividad de CaMKII. No obstante los niveles de producción de IL-12 no se recuperan al inhibir esta quinasa sino que son dependientes de la actividad de NF- $\kappa$ B. Es bien conocido que la señalización mediada por CaMKII y NF- $\kappa$ B es activada por la estimulación vía TLR (Kawai y Akira 2007; Liu y col. 2008; Liu y col. 2010), tratamiento que también bloquea la diferenciación de las DCs (Bartz y col. 2006; Wolfle y col. 2011). Macrófagos y células endoteliales también responden a Wnt5a activando esta ruta no canónica que promueve una respuesta pro-inflamatoria (Pereira y col. 2008; Kim y col. 2010). En macrófagos humanos el receptor que está implicado en el inicio de esta vía de señalización es Fzd5 (Blumenthal y col. 2006; Pereira y col. 2008), cuyos niveles de expresión se disparan en las primeras horas del proceso de diferenciación de los monocitos a DCs.

Mientras que, como hemos comentado antes, existen diversos trabajos que estudian el papel de la señalización Wnt canónica en la diferenciación y función de las DCs, se conoce mucho menos acerca de la función de Wnt5a en este proceso. Sin embargo, es bien conocido el papel de Wnt5a en situaciones de inflamación y que su expresión se incrementa en numerosos ambientes pro-inflamatorios. Así, tanto monocitos y macrófagos (Blumenthal y col. 2006), como

células estromáticas de la médula ósea (Rauner y col. 2012), incrementan la producción de Wnt5a en respuesta a diferentes estímulos bacterianos. Además Wnt5a es detectado en diferentes enfermedades inflamatorias humanas como en las lesiones granulomatosas de pacientes infectados con *Mycobacterium tuberculosis* (Blumenthal y col. 2006), en el suero y médula ósea de pacientes con sepsis o shock séptico (Pereira y col. 2008), en placas de aterosclerosis y sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide (Kim y col. 2010); así como en la piel de pacientes con psoriasis (Gudjonsson y col. 2010; Pourreynon y col. 2012).

Por otra parte se ha propuesto que Wnt5a puede tener una función oncogénica puesto que se sobreexpresa y está involucrado en la migración e invasión de muchos tipos de cáncer como en cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de páncreas y en melanoma (Huang y col. 2005; Kurayoshi y col. 2006; Pukrop y col. 2006; Ripka y col. 2007; O'Connell y col. 2008). Además se ha asociado su expresión con una mayor agresividad y un peor pronóstico en cáncer gástrico (Kurayoshi y col. 2006) y cáncer de próstata (Yamamoto y col. 2010).

Sin embargo otros estudios demuestran que Wnt5a inhibe el crecimiento celular, la migración y capacidad invasiva de algunos tipos de células cancerosas, indicando que Wnt5a podría actuar como factor supresor de tumores. En cáncer de colon, de tiroides y de hígado Wnt5a actúa como tal (Dejmek y col. 2005; Kremenevskaja y col. 2005; Liu y col. 2008), y también tiene actividad supresora de tumores en tejido hematopoyético (Liang y col. 2003). Así se ha demostrado que la expresión de Wnt5a está silenciada por metilación aberrante en múltiples leucemias y linfomas (Roman-Gomez y col. 2007; Ying y col. 2007), y que su expresión se recupera en pacientes en completa remisión, demostrando un papel de Wnt5a en la inhibición de la proliferación de las células leucémicas y en el desarrollo de la aparición de leucemias (Deng y col. 2011).

Por lo tanto, existen evidencias que demuestran tanto un papel oncogénico de Wnt5a como un papel supresor de tumores. Hasta el momento no se ha encontrado una explicación de cómo Wnt5a puede tener un efecto contrario en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

Una señal inflamatoria excesiva y prolongada en el tiempo causa daño tisular y toxicidad, procesos perjudiciales para el individuo. Por esta razón, algunas señales inductoras de inflamación también activan otros mecanismos homeostáticos que limitan los procesos inflamatorios. Uno de los mecanismos protectores más conocido es la tolerancia a endotoxina, fenómeno por el cual distintos tipos celulares, entre ellos los monocitos, tras la primera exposición a bajas concentraciones de endotoxina (LPS) reprograman su diferenciación de un estado pro-inflamatorio hacia un estado anti-inflamatorio tras el siguiente contacto con el estímulo bacteriano (Biswas y Lopez-Collazo 2009). Este estado de tolerancia a endotoxina se ha

descrito en monocitos de pacientes con sepsis (*Zanotti y col. 2002; Biswas y Lopez-Collazo 2009*).

Es fácil pensar que, bajo estas condiciones de inflamación, los monocitos podrían responder a Wnt5a, lo que interferiría en su diferenciación hacia DCs resultando en un efecto *in vivo* similar al que describimos en este trabajo. De acuerdo con esto, Wnt5a podría contribuir a la atenuación de la respuesta inflamatoria afectando negativamente a la función de las DCs que se diferencian tras el comienzo de un proceso inflamatorio, cuando los niveles de Wnt5a alcanzaran un nivel determinado. Asimismo, Wnt5a también podría ser uno de los factores que contribuyen a la disfunción que se observa en las DCs que se generan durante un proceso de sepsis polimicrobiana, alteración que interfiere con la resolución de una infección secundaria (*Pastille y col. 2011*). Apoyando esta idea, resultados recientes indican que Wnt5a podría ser un factor mediador en la reprogramación observada en los monocitos de pacientes con sepsis, así como en la diferenciación de los monocitos hacia macrófagos inmunosupresores bajo condiciones de inflamación *in vitro* (*Bergenfelz y col. 2012*). Además en pacientes con cáncer de mama se asocia la expresión de esta proteína con la presencia de macrófagos anti-inflamatorios con actividad inmunosupresora (*Bergenfelz y col. 2012*), lo que reduciría la respuesta anti-tumoral de estos pacientes, permitiendo el desarrollo del cáncer. Por otra parte, también se ha demostrado un papel de Wnt5a en la inhibición de producción de IFN $\alpha$  por parte de las pDCs observada en pacientes con melanoma, aunque en este caso el efecto no se produciría sobre el proceso de diferenciación de estas células sino sobre su activación inducida por CpG (*Hack y col. 2012*). Todos estos datos junto con los nuestros sugieren que Wnt5a podría tanto ser un factor implicado en la atenuación de una respuesta inflamatoria prolongada, como es el caso de los pacientes con sepsis, como ser uno de los mediadores que permiten a las células tumorales eludir al sistema inmune.

Sin embargo, el efecto de Wnt5a no depende sólo de su presencia y puede ser modulado de diferentes maneras. La concentración local de inhibidores solubles de Wnt5a o la respuesta a otras señales adicionales producidas durante los procesos de inflamación podrían anular las consecuencias negativas de Wnt5a, permitiendo un desarrollo normal de las DCs. De hecho, bajo condiciones inflamatorias se produce la diferenciación normal de moDCs (*Cheong y col. 2010; Dominguez y Ardavin 2010*).

Parece por tanto necesario conocer *in vivo* cual es el contexto específico en el que Wnt5a actúa, valorando simultáneamente la presencia de inhibidores o potenciadores de sus efectos así como las posibles células diana. Un desequilibrio en el balance entre estos factores podría ser la

clave para discernir situaciones patológicas donde la modulación de la señal Wnt5a fuera una estrategia adecuada de tratamiento.

Es en las DCs, en su condición inmadura, donde encontramos el espectro más amplio de expresión de receptores Wnt. Sin embargo, el tratamiento de estas células con Wnt5a no produce cambios ni en su supervivencia, ni en el patrón de expresión de marcadores de membrana, ni en la producción de citocinas que nos sugieran que Wnt5a sea un estímulo para las DCs. Al mismo tiempo, las DCs inmaduras producen Wnt5a y, aunque su expresión se incrementa significativamente tras estimulación, esta señal no es en sí misma una señal madurativa sino que, como luego discutiremos, modula aspectos concretos de este proceso.

Al contrario de lo que observamos en las DCs inmaduras, se ha demostrado que Wnt5a promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias en células endoteliales (*Kim y col. 2010*) y macrófagos (*Blumenthal y col. 2006; Pereira y col. 2008*), en ambos casos mediante la activación de la vía no canónica dependiente de  $Ca^{2+}$ . Aunque en el endotelio se desconoce el receptor que desencadena esta respuesta, en macrófagos Fzd5 es esencial (*Blumenthal y col. 2006; Pereira y col. 2008*). En las primeras horas del proceso de diferenciación de las DCs los niveles de Fzd5 son altos y la exposición de las células a Wnt5a desencadena la producción de citocinas de forma dependiente a esta vía de señalización. Sin embargo, durante el resto del ciclo de vida de las moDCs la expresión de Fzd5 es baja en comparación con la de otros receptores.

No obstante, Wnt5a induce un aumento en la capacidad de las DCs para captar dextrano mientras que no modifica su eficacia en la endocitosis de fase fluida. Ha sido descrito que Wnt5a promueve la endocitosis dependiente de vesículas de clatrina de sus propios receptores como parte del propio proceso de señalización (*Chen y col. 2003; Sato y col. 2010*) y por otro lado, Maiti y col (2012) demostraron que, en macrófagos, Wnt5a estimula la fagocitosis de bacterias mediante un mecanismo dependiente de Rac1. Sin embargo, en este trabajo también muestran que Wnt5a no estimula la endocitosis de dextrano en los macrófagos. El mecanismo de endocitosis y el efecto que Wnt5a puede ejercer sobre él pueden diferir sustancialmente entre las DCs y los macrófagos, y en cualquier caso, tanto la concentración de Wnt5a como de dextrano utilizada en este trabajo difiere de las utilizadas en nuestro estudio.

Al analizar el efecto de Wnt5a en la maduración de las DCs observamos que, tanto el pretratamiento como el tratamiento simultáneo de Wnt5a con el estímulo madurativo LPS no tienen ninguna repercusión en los cambios experimentados en los niveles de expresión de proteínas de membrana que se producen en las DCs como consecuencia del proceso madurativo. Sin embargo, en estas condiciones, la adición de Wnt5a sí tiene un efecto positivo en la

producción de IL-12, a la vez que reduce la secreción de IL-10. En consonancia con estos resultados, la señalización Wnt5a ya se ha relacionado con la capacidad de los macrófagos para producir IL-12 (*Blumenthal y col. 2006; Schaale y col. 2011*). Sin embargo, los cambios observados en la producción de IL-12 e IL-10 no se ven reflejados en una mejora de la capacidad aloestimuladora de estas DCs. Sólo se detecta una reducción significativa en los niveles de IL-10 en los sobrenadantes de los MLR establecidos con pre-Wnt5a-DCs, que no se asocia con cambios en la expansión de los linfocitos T.

Estos resultados sugieren en principio que el efecto de la señal vía TLR sería dominante sobre la señal inducida por el Wnt5a exógeno, al menos cuando se presentan simultáneamente, hecho que también parece ocurrir en la maduración de las DCs mediada por la disrupción de E-cadherina (*Jiang y col. 2007*). Alternativamente también podría ocurrir que las propias DCs produjeran Wnt5a y que, por tanto, el Wnt5a adicional no tuviera tanta relevancia en términos cuantitativos.

Esta segunda posibilidad quedó confirmada tras el estudio por PCRq de los niveles de expresión de Wnt5a a lo largo del ciclo de vida de las DCs. Estos resultados confirman y completan los previamente publicados por Lehtonen y colaboradores (2007), observando nosotros que Wnt5a es expresado por las DCs inmaduras y que su expresión se incrementa en respuesta a la estimulación vía TLR4, TLR3 o CD40, y también, aunque en menor medida, en respuesta a TNF $\alpha$ . Sin embargo, los niveles de Wnt5a no se modifican tras la estimulación de las DCs con un cóctel de citocinas pro-inflamatorias que, interesantemente da lugar a DCs maduras que apenas producen IL-12 (*Boullart y col. 2008*). Por otra parte, la estimulación vía TLR8 no sólo no induce el incremento de la producción de Wnt5a sino que reduce sus niveles de transcrito. De manera similar se ha descrito que la estimulación de macrófagos con distintos ligandos TLR también induce la producción de Wnt5a diferencialmente (*Pereira y col. 2008*). En contraste, las DCs expresaban niveles muy bajos de los otros dos ligandos Wnt estudiados, Wnt4 y Wnt11, por lo que Wnt5a sería el principal ligando Wnt no canónico expresado por las DCs, cuya producción se incrementa, de forma diferencial, tras estimulación.

No existen datos en la bibliografía en relación al papel que el Wnt5a producido por las DCs ejerce en su propia maduración y función. Con el fin de dilucidar esta función autocrina de Wnt5a, silenciamos su transcripción en DCs inmaduras mediante nucleofección con siRNA específicos. Como consecuencia de la transfección se bloquea específicamente el incremento en la expresión de Wnt5a que se produce durante la estimulación de las DCs, aunque su producción no se silencia completamente. El análisis de este tratamiento y su recuperación tras la adición de

Wnt5a permitió demostrar que es necesaria la expresión endógena de Wnt5a por parte de las DCs para su correcta maduración y función.

Nuestros resultados muestran que la reducción de la expresión de Wnt5a, al igual que ocurre con su adición, no afecta a la expresión de proteínas de membrana típicas de DCs maduras como CD40, CD80, CD86, HLA-DR, PD-L1 o PD-L2. Sin embargo, aunque Wnt5a exógeno no incrementa la viabilidad de las DCs, esta proteína parece ser un factor autocrino necesario para la supervivencia de las DCs. De forma similar, Wnt5a producido por las DCs foliculares actúa como un factor de supervivencia para células B de los centros germinales, activando la ruta no canónica dependiente de  $Ca^{+2}$  (Kim y col. 2012). También se ha descrito un papel de Wnt5a en la supervivencia/proliferación de precursores hematopoyéticos (Austin y col. 1997).

Por otro lado, y al contrario de lo observado tras el incremento de la señal Wnt5a, una menor expresión de este ligando durante la maduración afecta negativamente a la capacidad de las DCs para producir IL-12, lo que se traduce en una menor capacidad aloestimuladora. El número de células T recuperadas de los MLR establecidos con estas DCs era significativamente menor al igual que los niveles de  $IFN\gamma$ . Sin embargo, no detectamos un incremento en los niveles de IL-10.

Como ya hemos comentado, Wnt5a no es capaz de inducir por sí mismo la producción de IL-12 en DCs ni tampoco en macrófagos (Schaale y col. 2011), pero la adición de Wnt5a de forma simultánea al estímulo madurativo sí ejerce un efecto positivo sobre la producción de esta citocina. En apoyo de estas evidencias, la inhibición de la señal Wnt5a autocrina con anticuerpos anti Wnt5a o el silenciamiento de su expresión reduce la producción de IL-12 en respuesta a un estímulo en macrófagos (Blumenthal y col. 2006) y en DCs, respectivamente. Por tanto, parece lógico pensar que Wnt5a requiere de la señalización TLR para ejercer su efecto sobre la producción de esta citocina. Además, puesto que la estimulación de las DCs induce importantes cambios tanto en la expresión de los receptores Wnt como en la producción del propio ligando, es probable que en este momento se produzca un cambio en el tipo de respuesta de las DCs a Wnt5a. La producción de IL-12 por parte de las DCs se induce a través de diferentes mecanismos tales como la señalización vía TLR, vía CD40 o CCR5 (Liu y col. 2005), y por otra parte, se ha demostrado que ciertos miembros de la familia de proteínas NF- $\kappa$ B se unen al promotor de IL-12 induciendo su transcripción (Grumont y col. 2001). Por consiguiente, este podría ser uno de los posibles mecanismos a través de los cuales, en nuestros cultivos, Wnt5a estaría promoviendo la producción de IL-12.

A la vista de nuestros resultados no podemos asegurar qué ruta de señalización (canónica o no canónica) está activando Wnt5a tras ser producido por las DCs inmaduras. Sin embargo, puesto que GSK3 está constitutivamente activa en las DC inmaduras (*Rodionova y col. 2007*), no es difícil pensar que Wnt5a no puede estar activando la ruta Wnt canónica en las iDCs, puesto que además la estabilización de  $\beta$ -catenina en esta población conllevaría la adquisición de un fenotipo semimaduro (*Jiang y col. 2007; Rodionova y col. 2007*).

Posteriormente, durante la maduración de las DCs se produce una reducción en la actividad de GSK3 mediada por la fosforilación inhibitoria de Akt-1 (*Rodionova y col. 2007*), quinasa que se activa durante este proceso (*Luft y col. 2006*). Como consecuencia de esta inhibición parcial de la actividad de GSK3 tras la estimulación de las DCs se observa un ligero incremento en los niveles de  $\beta$ -catenina (*Rodionova y col. 2007*). Akt-1 es un mediador de la señalización Wnt canónica (*Fukumoto y col. 2001*) lo que podría sugerir que en el momento de la estimulación de las DCs se estuviera activando esta ruta. Entonces Wnt5a, que alcanza sus niveles máximos de expresión en este periodo del ciclo vital de las DCs, u otro ligando Wnt canónico por determinar, podría ser el responsable de la posible activación de la ruta Wnt canónica. Sin embargo, en ningún caso se ha demostrado que durante la estimulación de las DCs la inhibición de GSK3 esté mediada por un ligando Wnt. Además, es ampliamente conocido que la actividad de Akt-1 es regulada por numerosas señales independientes de Wnt (*Hers y col. 2011*).

No obstante, es necesaria cierta actividad de GSK3 durante la maduración normal de las DCs, puesto que al inhibir su actividad se reduce notablemente la producción de IL-12, IL-6 y TNF $\alpha$  por parte de estas células (*Rodionova y col. 2007*). Por tanto, en base a esto se podría decir que durante la maduración de las DCs Wnt5a no parece estar activando la ruta Wnt canónica. Apoyando esta idea, Jiang y colaboradores (2007) demostraron que la activación de la ruta de  $\beta$ -catenina, mediante la ruptura de la adhesión mediada por E-cadherina, en DCs derivadas de progenitores de médula ósea, induce un fallo en la maduración de las mismas. Estas DCs son incapaces de producir citocinas inflamatorias lo que conlleva la generación de células Treg, demostrándose así la función tolerogénica de estas células. Asimismo, la activación de la ruta Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina en DCs de la lámina propia intestinal es necesaria para la producción de moléculas anti-inflamatorias y la inducción de linfocitos Treg, inhibiendo, por tanto, la generación de linfocitos T efectores. Por lo tanto en estas células, la señalización a través de  $\beta$ -catenina promueve la diferenciación de las DCs hacia un estado tolerogénico limitando la respuesta inflamatoria (*Manicassamy y col. 2010*). Más recientemente se ha demostrado en ratón que la estabilización de  $\beta$ -catenina durante la estimulación de DCs

derivadas de progenitores de médula ósea tiene un efecto negativo en su maduración y función (*Ke y col. 2012*). Sin embargo estos autores no conectan la regulación de  $\beta$ -catenina con la activación de la ruta Wnt sino con la actividad de STAT3.

En relación al papel de Wnt5a en la maduración de otras poblaciones de DCs tan sólo hay un trabajo reciente que aborde este tema. Hack y colaboradores (2012) han descrito que Wnt5a inhibe la activación de las pDCs humanas, bloqueando el incremento en la expresión de CD80 y CD86, así como la producción de IFN $\alpha$ , inducida por CpG en estas células (*Hack y col. 2012*). Puesto que Wnt5a es producido por células de melanoma, los autores sugieren que Wnt5a podría ser uno de los factores que contribuyen a la inmunosupresión observada en estos pacientes inhibiendo la activación de las pDCs. No obstante, en este trabajo no demuestran qué ruta está activando Wnt5a en las pDCs.

El incremento en la producción de Wnt5a observado durante la estimulación de las DCs podría jugar un papel en su migración, aspecto fundamental de la biología de las DCs en respuesta a un estímulo. Diversos trabajos han puesto de manifiesto que Wnt5a está implicado en la migración de distintos tipos celulares, siendo esencial la activación de la ruta Wnt no canónica mediada por las GTPasas Rho y Rac (*Ishida-Takagishi y col. 2012*). Así, Wnt5a, a través de ROR2, induce la migración de fibroblastos embrionarios (*Nishita y col. 2006*) y, en células T, es necesario para la migración dependiente de CXCL12 (*Ghosh y col. 2009*). Además diferentes trabajos demuestran que Wnt5a induce la migración de células cancerígenas, promoviendo, por tanto, la metástasis (*Kurayoshi y col. 2006; Ripka y col. 2007; Hanaki y col. 2012; Zhu y col. 2013*). Incluso se ha propuesto que Wnt5a podría cooperar con la señalización a través de integrinas para regular el proceso de adhesión y migración (*Matsumoto y col. 2010*). Asimismo, Wnt5a induce la migración de monocitos y células T promoviendo la producción de quimioquinas por parte de células estromáticas de médula ósea (*Rauner y col. 2012*). Aunque en nuestro trabajo no hemos estudiado el papel de Wnt5a sobre la migración de las DCs, este un aspecto interesante para analizar en el futuro.

El silenciamiento de Wnt5a en las DCs tiene un impacto negativo en su capacidad aloestimuladora. La reducción en la producción de esta proteína por parte de las DCs daba lugar a una menor recuperación de células T en los MLR, menores niveles de IFN $\gamma$  en los sobrenadantes y, por el contrario, una mayor concentración de IL-10. Numerosos trabajos previos han descrito que diferentes componentes de la ruta de señalización Wnt influyen sobre el proceso de activación y diferenciación de los linfocitos T durante una respuesta inmune (*Xue y Zhao 2012*). Por tanto, este efecto podría ser consecuencia, no sólo de la relevancia de Wnt5a

como señal autocrina sobre las propias DCs, sino que también podría tener un papel paracrino sobre los linfocitos T *naive*.

Nuestro análisis por PCRq demuestra que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive* humanos de sangre periférica expresan receptores para los ligandos Wnt, confirmando que esta población puede responder directamente al Wnt5a secretado por las DCs. Entre los receptores analizados, Ryk es el que más se expresa en estas células, y como ya hemos comentado, Ryk es un receptor no convencional de la señalización Wnt, capaz de activar un amplio abanico de rutas de señalización, cuya expresión y función en células del sistema inmune no ha sido estudiada hasta la fecha (*Lu y col. 2004; Keeble y col. 2006*). Respecto a la expresión de los receptores Fzd, la cuantificación de sus niveles de transcrito muestra que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive* humanos expresan estos genes y que, en contraste con lo publicado por otros autores en células T humanas (*Wu y col. 2007*), sus niveles disminuyen tras activación. Sin embargo, diferencias metodológicas podrían explicar esta discrepancia, puesto que el trabajo de Wu y colaboradores (2007) muestra la expresión de estos receptores en linfocitos T totales, es decir, sin discriminar entre CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, memoria o *naive*, y el método de activación utilizado también difiere del llevado a cabo en nuestro estudio.

Ha sido descrito en reiteradas ocasiones que tanto la proliferación (*Cantrell y Smith 1984*) como la producción de IFN $\gamma$  por parte de linfocitos T humanos es dependiente de la señalización vía IL-2 (*Kasahara y col. 1983; Reem y Yeh 1984; Farrar y col. 1985; McDyer y col. 2002*). El mecanismo molecular por el cual IL-2 induce la producción de IFN $\gamma$  es a través de la unión de STAT5, mediador de esta señalización, al promotor de IFN $\gamma$ , lo que promueve su transcripción (*Bream y col. 2004*). La activación de la señalización Wnt5a durante la estimulación vía CD3/CD28 de linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive* humanos, bajo condiciones no polarizantes, tiene un efecto positivo en el sistema de señalización IL-2/IL-2R $\alpha$ , esencial durante la estimulación T. Asimismo, probablemente como consecuencia de lo anterior, se produce un incremento notable en el porcentaje de células productoras de IFN $\gamma$  y en el nivel de producción de esta citocina Th1. Este efecto positivo no se debe a un aumento global en la proliferación ni supervivencia de estas células. No obstante, a los 3 días de cultivo, momento en el que comienza a ser evidente la proliferación y el inicio de la expresión de CD25, observamos que el tratamiento con Wnt5a incrementa el porcentaje de células que expresan mayores niveles de este receptor y que son, a su vez, las que están proliferando. Esto nos sugiere que estos cultivos alcanzan antes el umbral IL-2/IL-2R $\alpha$  necesario para desencadenar su proliferación. A los 6 días del inicio de la estimulación,

se pierden las diferencias en proliferación entre los cultivos control y tratados con Wnt5a, aunque, en presencia de este ligando Wnt no canónico, la intensidad de expresión de CD25 sigue siendo significativamente mayor. Un efecto contrario se observa en linfocitos T humanos, tanto *naive* como memoria, tras la activación de la ruta Wnt canónica (Muralidharan y col. 2011), pues la adición de Wnt3a o la inhibición de GSK3 disminuye la expansión de estas células en respuesta a una estimulación vía CD3/CD28, reduciendo, además, la expresión del mediador de la activación CD25. Sin embargo estos tratamientos no afectan negativamente a la producción de IL-2 (Muralidharan y col. 2011).

La señalización Wnt5a también ha sido relacionada con la producción de IFN $\gamma$  por parte de linfocitos T CD4. En MLRs establecidos con macrófagos y células T memoria humanas, la inhibición de su señal utilizando anti-Wnt5a o anti-Fzd5 redujo significativamente la producción de IFN $\gamma$  (Blumenthal y col. 2006; Schaale y col. 2011). En contraste, se ha demostrado que la activación de la ruta Wnt canónica a través de Wnt3a o utilizando inhibidores de GSK3 reduce la capacidad de las células T para producir IFN $\gamma$  tanto en humano (Muralidharan y col. 2011) como en ratón (Driessens y col. 2011). De nuevo un ligando no canónico, como Wnt5a, ejerce un efecto sobre los linfocitos T contrario al observado tras la activación de la señalización Wnt canónica.

Por otra parte, como ya hemos comentado, la adición de Wnt5a durante la estimulación de los T CD4 *naive* no resulta en un incremento en el número de células recuperadas. Este parámetro sí se reducía en los MLR establecidos con DCs que apenas producen Wnt5a (Wnt5a-siRNA DCs). Por tanto, ahora podemos decir que esta reducción en la expansión de las células T es consecuencia directa de los cambios funcionales que sufren las DCs por ausencia de la señal Wnt5a autocrina.

Existen numerosos trabajos que estudian el papel de la señalización Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina en la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, sin embargo son pocos los estudios que analizan la función de la señalización Wnt no canónica en estas células. Se ha descrito que la señalización Wnt mediada por  $\beta$ -catenina regula la polarización de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a favor del linaje Th2, impidiendo su diferenciación hacia Th1 (Xue y Zhao 2012). Además promueve la supervivencia de los linfocitos Treg (Ding y col. 2008) mientras que TCF1, el factor de transcripción diana de esta señalización, inhibe la expresión de IL-17, sugiriendo que la señalización Wnt canónica afecta negativamente a la polarización Th17 (Yu y col. 2011). En

relación con estos resultados, un trabajo reciente demuestra que al inhibir la señalización Wnt con sFRP1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> se promueve la diferenciación Th17 (Lee y col. 2012). Igualmente el tratamiento de estas células con Wnt3a, bajo condiciones polarizantes hacia Th17, redujo la producción de IL-17 y el número de células productoras de esta citocina. Paradójicamente, estos autores obtuvieron el mismo efecto tratando las células con Wnt5a.

El análisis de los efectos de la activación de la señalización Wnt5a tanto durante la diferenciación de los monocitos humanos en DCs como en las DCs inmaduras y en su posterior maduración sugiere que Wnt5a juega un papel dual en estos procesos. Mientras que ejerce un efecto global anti-inflamatorio durante la diferenciación de las moDCs promoviendo la generación de DCs con características tolerogénicas, tiene una función opuesta durante el proceso de maduración de las mismas, promoviendo una respuesta pro-inflamatoria. Además la producción de Wnt5a por las propias DCs es necesaria para la correcta maduración y función de las mismas, y promueve una respuesta Th1 sobre los linfocitos T CD4 *naive*. Por último, puesto que se ha descrito la producción de Wnt5a *in vivo* en diferentes situaciones patológicas, como enfermedades inflamatorias, shock séptico y en distintos tipos de cáncer, sería importante conocer el contexto específico en el que tanto los monocitos como las DCs podrían responder a Wnt5a para poder modular esta señal como parte del tratamiento de estas enfermedades.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación nos permite concluir:

1. Los monocitos humanos expresan receptores para las proteínas Wnt y dicha expresión se regula durante el proceso de diferenciación y maduración de las moDCs
2. La estimulación de la señalización Wnt, especialmente a través de Wnt5a, interfiere en el proceso de diferenciación de las moDCs generándose DCs disfuncionales con características tolerogénicas.
3. El efecto de Wnt5a sobre la diferenciación de las DCs es dependiente de la actividad de CaMKII y NF- $\kappa$ B.
4. El incremento de la señal Wnt5a en las DCs inmaduras no supone un estímulo madurativo para las mismas y modifica ligeramente su respuesta a LPS.
5. Las DCs inmaduras expresan Wnt5a e incrementan diferencialmente su producción tras exposición con distintos estímulos madurativos.
6. La producción de Wnt5a por las DCs durante su estimulación es esencial para su correcta maduración y función, ejerciendo un papel autocrino sobre las DCs y un papel paracrino sobre los linfocitos T CD4 *naive*.
7. Los linfocitos T CD4 *naive* humanos expresan receptores para las proteínas Wnt.
8. Wnt5a ejerce un efecto positivo promoviendo la producción de IFN $\gamma$  e IL-2 durante la activación de linfocitos T CD4 *naive* humanos.
9. Wnt5a podría ser una de las moléculas moduladoras de la respuesta inmune que jugaría un papel dual durante la diferenciación y maduración de las DCs derivadas de monocitos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Alessandrini, A., De Haseth, S., Fray, M., Miyajima, M., Colvin, R.B., Williams, W.W., Benedict Cosimi, A., Benichou, G. (2011). Dendritic cell maturation occurs through the inhibition of GSK-3beta. *Cell Immunol* 270(2): 114-25.
- Andre, P., Wang, Q., Wang, N., Gao, B., Schilit, A., Halford, M.M., Stacker, S.A., Zhang, X., Yang, Y. (2012). The wnt coreceptor ryk regulates wnt/planar cell polarity by modulating the degradation of the core planar cell polarity component vangl2. *J Biol Chem* 287(53): 44518-25.
- Angers, S., Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(7): 468-77.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669-92.
- Austin, T.W., Solar, G.P., Ziegler, F.C., Liem, L., Matthews, W. (1997). A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood* 89(10): 3624-35.
- Bachem, A., Guttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzel, P.M., Gurka, S., Kroczeck, R.A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* 207(6): 1273-81.
- Bachem, A., Hartung, E., Guttler, S., Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., Plantinga, M., Mazzini, E., Stoitzner, P., Gurka, S., Henn, V., Mages, H.W., Kroczeck, R.A. (2012). Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol* 3: 214.
- Bansal, K., Trinath, J., Chakravorty, D., Patil, S.A., Balaji, K.N. (2011). Pathogen-specific TLR2 protein activation programs macrophages to induce Wnt-beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 286(42): 37032-44.
- Bartz, H., Avalos, N.M., Baetz, A., Heeg, K., Dalpke, A.H. (2006). Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor-mediated block of dendritic cell differentiation. *Blood* 108(13): 4102-8.
- Becker, M.R., Choi, Y.S., Millar, S.E., Udey, M.C. (2011). Wnt signaling influences the development of murine epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 131(9): 1861-8.
- Belz, G.T., Nutt, S.L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 12(2): 101-13.
- Bergenfelz, C., Medrek, C., Ekstrom, E., Jirstrom, K., Janols, H., Wullt, M., Bredberg, A., Leandersson, K. (2012). Wnt5a induces a tolerogenic phenotype of macrophages in sepsis and breast cancer patients. *J Immunol* 188(11): 5448-58.
- Beurel, E., Michalek, S.M., Jope, R.S. (2010). Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 31(1): 24-31.
- Beurel, E., Yeh, W.I., Michalek, S.M., Harrington, L.E., Jope, R.S. (2011). Glycogen synthase kinase-3 is an early determinant in the differentiation of pathogenic Th17 cells. *J Immunol* 186(3): 1391-8.
- Bilkovski, R., Schulte, D.M., Oberhauser, F., Mauer, J., Hampel, B., Gutschow, C., Krone, W., Laudes, M. (2011). Adipose tissue macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans. *Int J Obes (Lond)* 35(11): 1450-4.
- Biswas, S.K., Lopez-Collazo, E. (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 30(10): 475-87.
- Blumenthal, A., Ehlers, S., Lauber, J., Buer, J., Lange, C., Goldmann, T., Heine, H., Brandt, E., Reiling, N. (2006). The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108(3): 965-73.

- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., Stanley, E.R., Nussenzweig, M., Lira, S.A., Randolph, G.J., Merad, M. (2009).** Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31(3): 513-25.
- Bogunovic, M., Mortha, A., Muller, P.A., Merad, M. (2012).** Mononuclear phagocyte diversity in the intestine. *Immunol Res* 54(1-3): 37-49.
- Boullart, A.C., Aarntzen, E.H., Verdijk, P., Jacobs, J.F., Schuurhuis, D.H., Benitez-Ribas, D., Schreiber, G., van de Rakt, M.W., Scharenborg, N.M., de Boer, A., Kramer, M., Figdor, C.G., Punt, C.J., Adema, G.J., de Vries, I.J. (2008).** Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol Immunother* 57(11): 1589-97.
- Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., Rando, T.A. (2007).** Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317(5839): 807-10.
- Bradley, E.W., Drissi, M.H. (2010).** WNT5A regulates chondrocyte differentiation through differential use of the CaN/NFAT and IKK/NF-kappaB pathways. *Mol Endocrinol* 24(8): 1581-93.
- Bream, J.H., Hodge, D.L., Gonsky, R., Spolski, R., Leonard, W.J., Krebs, S., Targan, S., Morinobu, A., O'Shea, J.J., Young, H.A. (2004).** A distal region in the interferon-gamma gene is a site of epigenetic remodeling and transcriptional regulation by interleukin-2. *J Biol Chem* 279(39): 41249-57.
- Brocker, T. (1997).** Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186(8): 1223-32.
- Cantrell, D.A., Smith, K.A. (1984).** The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* 224(4655): 1312-6.
- Cervantes-Barragan, L., Lewis, K.L., Firner, S., Thiel, V., Hugues, S., Reith, W., Ludewig, B., Reizis, B. (2012).** Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(8): 3012-7.
- Clevers, H., Nusse, R. (2012).** Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149(6): 1192-205.
- Conti, L., Gessani, S. (2008).** GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances. *Immunobiology* 213(9-10): 859-70.
- Crocker, B.A., Kiu, H., Nicholson, S.E. (2008).** SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19(4): 414-22.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.A., Ventre, E., Vu Manh, T.P., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M. (2010).** The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 207(6): 1283-92.
- Crozat, K., Guiton, R., Williams, M., Henri, S., Baranek, T., Schwartz-Cornil, I., Malissen, B., Dalod, M. (2010).** Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol Rev* 234(1): 177-98.
- Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.P., Fossun, E., Luche, H., Ardouin, L., Williams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., Henri, S., Dalod, M. (2011).** Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8alpha+ type. *J Immunol* 187(9): 4411-5.
- Cruciat, C.M., Niehrs, C. (2012).** Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.

- Chamorro, S., Garcia-Vallejo, J.J., Unger, W.W., Fernandes, R.J., Bruijns, S.C., Laban, S., Roep, B.O., Hart, B.A., van Kooyk, Y. (2009).** TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J Immunol* 183(5): 2984-94.
- Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., Roth, M.G., Amatruda, J.F., Chen, C., Lum, L. (2009).** Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol* 5(2): 100-7.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L.A., Miller, W.E., Caron, M.G., Barak, L.S., Nusse, R., Lefkowitz, R.J. (2003).** Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 301(5638): 1391-4.
- Cheng, C.W., Smith, S.K., Charnock-Jones, D.S. (2003).** Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology. *Exp Cell Res* 291(2): 415-25.
- Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., Koh, H., Rodriguez, A., Idoyaga, J., Pack, M., Velinzon, K., Park, C.G., Steinman, R.M. (2010).** Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143(3): 416-29.
- Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., Palucka, A.K. (2000).** IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1(6): 510-4.
- Chomarat, P., Dantin, C., Bennett, L., Banchereau, J., Palucka, A.K. (2003).** TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J Immunol* 171(5): 2262-9.
- Christman, M.A., 2nd, Goetz, D.J., Dickerson, E., McCall, K.D., Lewis, C.J., Benencia, F., Silver, M.J., Kohn, L.D., Malgor, R. (2008).** Wnt5a is expressed in murine and human atherosclerotic lesions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6): H2864-70.
- Chu, C.C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Gryns, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., Peakman, M., Lombardi, G., Nestle, F.O. (2012).** Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J Exp Med* 209(5): 935-45.
- Dai, C., Wen, X., He, W., Liu, Y. (2011).** Inhibition of proinflammatory RANTES expression by TGF-beta1 is mediated by glycogen synthase kinase-3beta-dependent beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 286(9): 7052-9.
- De Trez, C., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., Muraille, E. (2009).** iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS Pathog* 5(6): e1000494.
- Dejmek, J., Dejmek, A., Saffholm, A., Sjolander, A., Andersson, T. (2005).** Wnt-5a protein expression in primary duodenal colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. *Cancer Res* 65(20): 9142-6.
- del Rio, M.L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.I., Forster, R. (2010).** Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunol Rev* 234(1): 268-81.
- Delneste, Y., Charbonnier, P., Herbault, N., Magistrelli, G., Caron, G., Bonnefoy, J.Y., Jeannin, P. (2003).** Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood* 101(1): 143-50.
- Deng, G., Li, Z.Q., Zhao, C., Yuan, Y., Niu, C.C., Zhao, C., Pan, J., Si, W.K. (2011).** WNT5A expression is regulated by the status of its promoter methylation in leukaemia and can inhibit leukemic cell malignant proliferation. *Oncol Rep* 25(2): 367-76.

- Deng, J., Miller, S.A., Wang, H.Y., Xia, W., Wen, Y., Zhou, B.P., Li, Y., Lin, S.Y., Hung, M.C. (2002). beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2(4): 323-34.
- Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M.S., Dwyer, D., Korb, A., Smolen, J., Hoffmann, M., Scheinecker, C., van der Heide, D., Landewe, R., Lacey, D., Richards, W.G., Schett, G. (2007). Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 13(2): 156-63.
- Die, L., Yan, P., Jun Jiang, Z., Min Hua, T., Cai, W., Xing, L. (2012). Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitor suppresses *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced CD40 expression by inhibiting nuclear factor-kappa B activation in mouse osteoblasts. *Mol Immunol* 52(1): 38-49.
- Dimitriou, I.D., Clemenza, L., Scotter, A.J., Chen, G., Guerra, F.M., Rottapel, R. (2008). Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol Rev* 224: 265-83.
- Ding, Y., Shen, S., Lino, A.C., Curotto de Lafaille, M.A., Lafaille, J.J. (2008). Beta-catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. *Nat Med* 14(2): 162-9.
- Dominguez, P.M., Ardavin, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 234(1): 90-104.
- Dosen, G., Tenstad, E., Nygren, M.K., Stubberud, H., Funderud, S., Rian, E. (2006). Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunol* 7: 13.
- Driessens, G., Zheng, Y., Locke, F., Cannon, J.L., Gounari, F., Gajewski, T.F. (2011). Beta-catenin inhibits T cell activation by selective interference with linker for activation of T cells-phospholipase C-gamma1 phosphorylation. *J Immunol* 186(2): 784-90.
- Du, Q., Zhang, X., Cardinal, J., Cao, Z., Guo, Z., Shao, L., Geller, D.A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling regulates cytokine-induced human inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in cancer cells. *Cancer Res* 69(9): 3764-71.
- Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., Bhattacharya, D., Stappenbeck, T.S., Holtzman, M.J., Sung, S.S., Murphy, T.L., Hildner, K., Murphy, K.M. (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207(4): 823-36.
- Eidsmo, L., Allan, R., Caminschi, I., van Rooijen, N., Heath, W.R., Carbone, F.R. (2009). Differential migration of epidermal and dermal dendritic cells during skin infection. *J Immunol* 182(5): 3165-72.
- Escribano, C., Delgado-Martin, C., Rodriguez-Fernandez, J.L. (2009). CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3beta. *J Immunol* 183(10): 6282-95.
- Ezzelarab, M., Thomson, A.W. (2011). Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin Immunol* 23(4): 252-63.
- Farrar, W.L., Ruscetti, F.W., Young, H.A. (1985). 5-Azacytidine treatment of a murine cytotoxic T cell line alters interferon-gamma gene induction by interleukin 2. *J Immunol* 135(3): 1551-4.
- Fleming, H.E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K.M., Kronenberg, H.M., Scadden, D.T. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* 2(3): 274-83.
- Fradkin, L.G., Dura, J.M., Noordermeer, J.N. (2010). Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system. *Trends Neurosci* 33(2): 84-92.

- Fu, C., Jiang, A. (2010).** Generation of tolerogenic dendritic cells via the E-cadherin/beta-catenin-signaling pathway. *Immunol Res* 46(1-3): 72-8.
- Fukuda, T., Chen, L., Endo, T., Tang, L., Lu, D., Castro, J.E., Widhopf, G.F., 2nd, Rassenti, L.Z., Cantwell, M.J., Prussak, C.E., Carson, D.A., Kipps, T.J. (2008).** Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(8): 3047-52.
- Fukumoto, S., Hsieh, C.M., Maemura, K., Layne, M.D., Yet, S.F., Lee, K.H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Taylor, W.G., Rubin, J.S., Perrella, M.A., Lee, M.E. (2001).** Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem* 276(20): 17479-83.
- Gabriele, L., Ozato, K. (2007).** The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev* 18(5-6): 503-10.
- Gao, C., Chen, Y.G. (2010).** Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22(5): 717-27.
- Gattinoni, L., Zhong, X.S., Palmer, D.C., Ji, Y., Hinrichs, C.S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L.M., Paulos, C.M., Muranski, P., Restifo, N.P. (2009).** Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med* 15(7): 808-13.
- Gazit, A., Yaniv, A., Bafico, A., Pramila, T., Igarashi, M., Kitajewski, J., Aaronson, S.A. (1999).** Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response. *Oncogene* 18(44): 5959-66.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010).** Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327(5966): 656-61.
- Ghosh, M.C., Collins, G.D., Vandanmagsar, B., Patel, K., Brill, M., Carter, A., Lustig, A., Becker, K.G., Wood, W.W., 3rd, Emeche, C.D., French, A.D., O'Connell, M.P., Xu, M., Weeraratna, A.T., Taub, D.D. (2009).** Activation of Wnt5A signaling is required for CXCL12 chemokine ligand 12-mediated T-cell migration. *Blood* 114(7): 1366-73.
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., Stanley, E.R., Nussenzweig, M., Merad, M. (2009).** The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* 206(13): 3115-30.
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubreau, M., Dai, X.M., Stanley, E.R., Randolph, G.J., Merad, M. (2006).** Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7(3): 265-73.
- Glinka, A., Dolde, C., Kirsch, N., Huang, Y.L., Kazanskaya, O., Ingelfinger, D., Boutros, M., Cruciat, C.M., Niehrs, C. (2011).** LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep* 12(10): 1055-61.
- Gordon, M.D., Nusse, R. (2006).** Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 281(32): 22429-33.
- Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Kannookadan, S., Ochsenreiter, M., Popova, A., Yu, X., Mamidi, S., Stonehouse-Usselman, E., Muller-Molinet, I., Gooi, L., Goerdts, S. (2008).** Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-beta receptor II. *J Immunol* 180(10): 6553-65.
- Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A.N., Aaronson, S.A. (2010).** Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev* 24(22): 2517-30.

- Grumont, R., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Gugasyan, R., White, C., Caminschi, I., Cook, W., Gerondakis, S. (2001). c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+) dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J Exp Med* 194(8): 1021-32.
- Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Stoll, S.W., Riblett, M.B., Xing, X., Kochkodan, J.J., Ding, J., Nair, R.P., Aphale, A., Voorhees, J.J., Elder, J.T. (2010). Evidence for altered Wnt signaling in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 130(7): 1849-59.
- Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M., Malissen, B. (2010). From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur J Immunol* 40(8): 2089-94.
- Guilliams, M., Movahedi, K., Bosschaerts, T., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Herin, M., Acosta-Sanchez, A., Ma, L., Moser, M., Van Ginderachter, J.A., Brys, L., De Baetselier, P., Beschin, A. (2009). IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection. *J Immunol* 182(2): 1107-18.
- Hack, K., Reilly, L., Proby, C., Fleming, C., Leigh, I., Foerster, J. (2012). Wnt5a inhibits the CpG oligodeoxynucleotide-triggered activation of human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Exp Dermatol* 37(5): 557-61.
- Hacker, C., Kirsch, R.D., Ju, X.S., Hieronymus, T., Gust, T.C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S.M., Rose-John, S., Yokota, Y., Zenke, M. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* 4(4): 380-6.
- Hanaki, H., Yamamoto, H., Sakane, H., Matsumoto, S., Ohdan, H., Sato, A., Kikuchi, A. (2012). An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Ther* 11(2): 298-307.
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., Larbi, A., Tan, P., Zhao, H., Poidinger, M., Pagan, S., Cookson, S., Dickinson, R., Dimmick, I., Jarrett, R.F., Renia, L., Tam, J., Song, C., Connolly, J., Chan, J.K., Gehring, A., Bertozzi, A., Collin, M., Ginhoux, F. (2012). Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37(1): 60-73.
- Hattori, N., Kawamoto, H., Fujimoto, S., Kuno, K., Katsura, Y. (1996). Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus. *J Exp Med* 184(3): 1137-47.
- Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M., Merad, M. (2010). Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol Rev* 234(1): 55-75.
- Hendrickx, M., Leyns, L. (2008). Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. *Dev Growth Differ* 50(4): 229-43.
- Henri, S., Guilliams, M., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Dalod, M., Malissen, B. (2010). Disentangling the complexity of the skin dendritic cell network. *Immunol Cell Biol* 88(4): 366-75.
- Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., de Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., Malissen, B. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 207(1): 189-206.
- Hers, I., Vincent, E.E., Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23(10): 1515-27.
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S.H., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S.J., Stanley, E.R., Chan, J.K., Ng, L.G., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F. (2012).

- Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 209(6): 1167-81.
- Hohl, T.M., Rivera, A., Lipuma, L., Gallegos, A., Shi, C., Mack, M., Pamer, E.G. (2009).** Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe* 6(5): 470-81.
- Hsieh, J.C. (2004).** Specificity of WNT-receptor interactions. *Front Biosci* 9: 1333-8.
- Huang, C.L., Liu, D., Nakano, J., Ishikawa, S., Kontani, K., Yokomise, H., Ueno, M. (2005).** Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23(34): 8765-73.
- Hutchins, B.I., Li, L., Kalil, K. (2012).** Wnt-induced calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Sci Signal* 5(206): pt1.
- Iborra, S., Izquierdo, H.M., Martinez-Lopez, M., Blanco-Menendez, N., Reis e Sousa, C., Sancho, D. (2012).** The DC receptor DNCR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J Clin Invest* 122(5): 1628-43.
- Ichii, M., Frank, M.B., Iozzo, R.V., Kincade, P.W. (2012).** The canonical Wnt pathway shapes niches supportive of hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 119(7): 1683-92.
- Iliev, I.D., Spadoni, I., Mileti, E., Matteoli, G., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Foschi, D., Caprioli, F., Viale, G., Rescigno, M. (2009).** Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 58(11): 1481-9.
- Ishida-Takagishi, M., Enomoto, A., Asai, N., Ushida, K., Watanabe, T., Hashimoto, T., Kato, T., Weng, L., Matsumoto, S., Asai, M., Murakumo, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., Takahashi, M. (2012).** The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. *Nat Commun* 3: 859.
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., Agace, W.W. (2008).** Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205(9): 2139-49.
- Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V., Banchereau, J. (2003).** Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19(2): 225-34.
- Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J.A., Connolly, J., Banchereau, J., Mellman, I. (2007).** Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27(4): 610-24.
- Joffre, O., Nolte, M.A., Sporri, R., Reis e Sousa, C. (2009).** Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 227(1): 234-47.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., Vulink, A.J., Hart, D.N., Radford, K.J. (2010).** Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 207(6): 1247-60.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., Enk, A.H. (2000).** Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192(9): 1213-22.
- Kasahara, T., Hooks, J.J., Dougherty, S.F., Oppenheim, J.J. (1983).** Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *J Immunol* 130(4): 1784-9.
- Kassianos, A.J., Hardy, M.Y., Ju, X., Vijayan, D., Ding, Y., Vulink, A.J., McDonald, K.J., Jongbloed, S.L., Wadley, R.B., Wells, C., Hart, D.N., Radford, K.J. (2012).** Human CD1c (BDCA-1)+ myeloid dendritic cells secrete IL-10 and display an immuno-

- regulatory phenotype and function in response to *Escherichia coli*. *Eur J Immunol* 42(6): 1512-22.
- Kawai, T., Akira, S. (2007).** Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13(11): 460-9.
- Kawano, Y., Kypta, R. (2003).** Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116(Pt 13): 2627-34.
- Kawasaki, A., Torii, K., Yamashita, Y., Nishizawa, K., Kanekura, K., Katada, M., Ito, M., Nishimoto, I., Terashita, K., Aiso, S., Matsuoka, M. (2007).** Wnt5a promotes adhesion of human dermal fibroblasts by triggering a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signal. *Cell Signal* 19(12): 2498-506.
- Ke, B., Shen, X.D., Kamo, N., Ji, H., Yue, S., Gao, F., Busuttill, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W. (2012).** beta-Catenin regulates innate and adaptive immunity in mouse liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*.
- Keeble, T.R., Halford, M.M., Seaman, C., Kee, N., Macheda, M., Anderson, R.B., Stacker, S.A., Cooper, H.M. (2006).** The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* 26(21): 5840-8.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A. (2009).** Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol* 19(3): 119-29.
- Kim, G.H., Her, J.H., Han, J.K. (2008).** Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements. *J Cell Biol* 182(6): 1073-82.
- Kim, J., Chang, W., Jung, Y., Song, K., Lee, I. (2012a).** Wnt5a activates THP-1 monocytic cells via a beta-catenin-independent pathway involving JNK and NF-kappaB activation. *Cytokine* 60(1): 242-8.
- Kim, J., Kim, D.W., Chang, W., Choe, J., Kim, J., Park, C.S., Song, K., Lee, I. (2012b).** Wnt5a is secreted by follicular dendritic cells to protect germinal center B cells via Wnt/Ca<sup>2+</sup>/NFAT/NF-kappaB-B cell lymphoma 6 signaling. *J Immunol* 188(1): 182-9.
- Kim, J., Kim, J., Kim, D.W., Ha, Y., Ihm, M.H., Kim, H., Song, K., Lee, I. (2010).** Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. *J Immunol* 185(2): 1274-82.
- Klamer, G., Song, E., Ko, K.H., O'Brien, T.A., Dolnikov, A. (2010).** Using small molecule GSK3beta inhibitors to treat inflammation. *Curr Med Chem* 17(26): 2873-81.
- Komiya, Y., Habas, R. (2008).** Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4(2): 68-75.
- Kremenevskaja, N., von Wasielewski, R., Rao, A.S., Schofl, C., Andersson, T., Brabant, G. (2005).** Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 24(13): 2144-54.
- Krutzik, S.R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M.T., Liu, P.T., Sharfstein, S.E., Graeber, T.G., Sieling, P.A., Liu, Y.J., Rea, T.H., Bloom, B.R., Modlin, R.L. (2005).** TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 11(6): 653-60.
- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., Moon, R.T. (2000).** The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16(7): 279-83.
- Kuo, P.L., Hung, J.Y., Huang, S.K., Chou, S.H., Cheng, D.E., Jong, Y.J., Hung, C.H., Yang, C.J., Tsai, Y.M., Hsu, Y.L., Huang, M.S. (2011).** Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway. *J Immunol* 186(3): 1521-30.
- Kurayoshi, M., Oue, N., Yamamoto, H., Kishida, M., Inoue, A., Asahara, T., Yasui, W., Kikuchi, A. (2006).** Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* 66(21): 10439-48.

- Lambrecht, B.N., Hammad, H. (2012).** Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 30: 243-70.
- Lee, Y.S., Lee, K.A., Yoon, H.B., Yoo, S.A., Park, Y.W., Chung, Y., Kim, W.U., Kang, C.Y. (2012).** The Wnt inhibitor secreted Frizzled-Related Protein 1 (sFRP1) promotes human Th17 differentiation. *Eur J Immunol* 42(10): 2564-73.
- Lehtonen, A., Ahlfors, H., Veckman, V., Miettinen, M., Lahesmaa, R., Julkunen, I. (2007).** Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *J Leukoc Biol* 82(3): 710-20.
- Leon, B., Lopez-Bravo, M., Ardavin, C. (2007).** Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26(4): 519-31.
- Li, C., Chen, H., Hu, L., Xing, Y., Sasaki, T., Villosis, M.F., Li, J., Nishita, M., Minami, Y., Minoo, P. (2008).** Ror2 modulates the canonical Wnt signaling in lung epithelial cells through cooperation with Fzd2. *BMC Mol Biol* 9: 11.
- Li, Y., Chu, N., Rostami, A., Zhang, G.X. (2006).** Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J Immunol* 177(3): 1679-88.
- Liang, H., Chen, Q., Coles, A.H., Anderson, S.J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R., Jones, S.N. (2003).** Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 4(5): 349-60.
- Liu, G., Zhang, L., Zhao, Y. (2010).** Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clin Exp Immunol* 160(2): 168-75.
- Liu, H., Fergusson, M.M., Castilho, R.M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, D., Rovira, II, Schimel, D., Kuo, C.J., Gutkind, J.S., Hwang, P.M., Finkel, T. (2007).** Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 317(5839): 803-6.
- Liu, J., Cao, S., Kim, S., Chung, E.Y., Homma, Y., Guan, X., Jimenez, V., Ma, X. (2005).** Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr Immunol Rev* 1(2): 119-137.
- Liu, J., Guan, X., Tamura, T., Ozato, K., Ma, X. (2004).** Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. *J Biol Chem* 279(53): 55609-17.
- Liu, K.J., Lee, Y.L., Yang, Y.Y., Shih, N.Y., Ho, C.C., Wu, Y.C., Huang, T.S., Huang, M.C., Liu, H.C., Shen, W.W., Leu, S.J. (2011).** Modulation of the development of human monocyte-derived dendritic cells by lithium chloride. *J Cell Physiol* 226(2): 424-33.
- Liu, X., Yao, M., Li, N., Wang, C., Zheng, Y., Cao, X. (2008).** CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages. *Blood* 112(13): 4961-70.
- Liu, X., Zhan, Z., Xu, L., Ma, F., Li, D., Guo, Z., Li, N., Cao, X. (2010).** MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKIIalpha. *J Immunol* 185(12): 7244-51.
- Liu, X.H., Pan, M.H., Lu, Z.F., Wu, B., Rao, Q., Zhou, Z.Y., Zhou, X.J. (2008).** Expression of Wnt-5a and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 40(7): 560-7.
- Liu, Y.J. (2005).** IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23: 275-306.
- Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., Baltimore, D. (2004).** Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119(1): 97-108.
- Luft, T., Rodionova, E., Maraskovsky, E., Kirsch, M., Hess, M., Buchholtz, C., Goerner, M., Schnurr, M., Skoda, R., Ho, A.D. (2006).** Adaptive functional differentiation of

- dendritic cells: integrating the network of extra- and intracellular signals. *Blood* 107(12): 4763-9.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N.A., Menges, M., Rossner, S., Schuler, G. (2000).** Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy in vitro. *Eur J Immunol* 30(4): 1048-52.
- Ma, J., Wang, R., Fang, X., Ding, Y., Sun, Z. (2011).** Critical role of TCF-1 in repression of the IL-17 gene. *PLoS One* 6(9): e24768.
- Ma, J., Wang, R., Fang, X., Sun, Z. (2012).** beta-Catenin/TCF-1 Pathway in T Cell Development and Differentiation. *J Neuroimmune Pharmacol*.
- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., Steinman, R.M. (2000).** The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151(3): 673-84.
- Maier, E., Duschl, A., Horejs-Hoeck, J. (2012).** STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. *Eur J Immunol*.
- Maiti, G., Naskar, D., Sen, M. (2012).** The Wingless homolog Wnt5a stimulates phagocytosis but not bacterial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(41): 16600-5.
- Maldonado, R.A., von Andrian, U.H. (2010).** How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol* 108: 111-65.
- Malhotra, S., Baba, Y., Garrett, K.P., Staal, F.J., Gerstein, R., Kincade, P.W. (2008).** Contrasting responses of lymphoid progenitors to canonical and noncanonical Wnt signals. *J Immunol* 181(6): 3955-64.
- Malhotra, S., Kincade, P.W. (2009).** Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 4(1): 27-36.
- Manicassamy, S., Pulendran, B. (2011).** Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev* 241(1): 206-27.
- Manicassamy, S., Reizis, B., Ravindran, R., Nakaya, H., Salazar-Gonzalez, R.M., Wang, Y.C., Pulendran, B. (2010).** Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science* 329(5993): 849-53.
- Martin-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbi, A.L., Toribio, M.L. (2010).** Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 115(26): 5366-75.
- Matsumoto, S., Fumoto, K., Okamoto, T., Kaibuchi, K., Kikuchi, A. (2010).** Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. *Embo J* 29(7): 1192-204.
- Mayer, C.T., Berod, L., Sparwasser, T. (2012).** Layers of dendritic cell-mediated T cell tolerance, their regulation and the prevention of autoimmunity. *Front Immunol* 3: 183.
- Mayumi, N., Watanabe, E., Norose, Y., Watari, E., Kawana, S., Geijtenbeek, T.B., Takahashi, H. (2012).** E-cadherin interactions required for Langerhans cell differentiation. *Eur J Immunol*.
- McDyer, J.F., Li, Z., John, S., Yu, X., Wu, C.Y., Ragheb, J.A. (2002).** IL-2 receptor blockade inhibits late, but not early, IFN-gamma and CD40 ligand expression in human T cells: disruption of both IL-12-dependent and -independent pathways of IFN-gamma production. *J Immunol* 169(5): 2736-46.
- Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., Engleman, E.G. (2002).** Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3(12): 1135-41.
- Mikels, A.J., Nusse, R. (2006).** Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4(4): e115.

- Minear, S., Leucht, P., Jiang, J., Liu, B., Zeng, A., Fuerer, C., Nusse, R., Helms, J.A. (2010).** Wnt proteins promote bone regeneration. *Sci Transl Med* 2(29): 29ra30.
- Muralidharan, S., Hanley, P.J., Liu, E., Chakraborty, R., Bollard, C., Shpall, E., Rooney, C., Savoldo, B., Rodgers, J., Dotti, G. (2011).** Activation of Wnt signaling arrests effector differentiation in human peripheral and cord blood-derived T lymphocytes. *J Immunol* 187(10): 5221-32.
- Murdoch, B., Chadwick, K., Martin, M., Shojaei, F., Shah, K.V., Gallacher, L., Moon, R.T., Bhatia, M. (2003).** Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3422-7.
- Murphy, K.M. (2011).** Comment on "Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine". *Science* 333(6041): 405; author reply 405.
- Nace, G., Evankovich, J., Eid, R., Tsung, A. (2012).** Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity. *J Innate Immun* 4(1): 6-15.
- Naik, S.H. (2008).** Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* 86(5): 439-52.
- Nakano, H., Lin, K.L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D.N., Kakiuchi, T., Gunn, M.D. (2009).** Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat Immunol* 10(4): 394-402.
- Nemeth, M.J., Bodine, D.M. (2007).** Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Res* 17(9): 746-58.
- Nemeth, M.J., Topol, L., Anderson, S.M., Yang, Y., Bodine, D.M. (2007).** Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39): 15436-41.
- Neumann, J., Schaale, K., Farhat, K., Endermann, T., Ulmer, A.J., Ehlers, S., Reiling, N. (2010).** Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Faseb J* 24(11): 4599-612.
- Nishita, M., Itsukushima, S., Nomachi, A., Endo, M., Wang, Z., Inaba, D., Qiao, S., Takada, S., Kikuchi, A., Minami, Y. (2010).** Ror2/Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cell Biol* 30(14): 3610-9.
- Nishita, M., Yoo, S.K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., Minami, Y. (2006).** Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol* 175(4): 555-62.
- Notani, D., Gottimukkala, K.P., Jayani, R.S., Limaye, A.S., Damle, M.V., Mehta, S., Purbey, P.K., Joseph, J., Galande, S. (2010).** Global regulator SATB1 recruits beta-catenin and regulates T(H)2 differentiation in Wnt-dependent manner. *PLoS Biol* 8(1): e1000296.
- Nusse, R. (2008).** Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res* 18(5): 523-7.
- O'Connell, M.P., French, A.D., Leotlela, P.D., Weeraratna, A.T. (2008).** Assaying Wnt5A-mediated invasion in melanoma cells. *Methods Mol Biol* 468: 243-53.
- Oestreich, K.J., Huang, A.C., Weinmann, A.S.** The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med* 208(5): 1001-13.
- Oestreich, K.J., Huang, A.C., Weinmann, A.S. (2011).** The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns. *J Exp Med* 208(5): 1001-13.
- Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G.C., Mundlos, S., Shibuya, H., Takada, S., Minami, Y.**

- (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8(7): 645-54.
- Ono, T., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., Nonomura, K., Onoe, K. (2007).** Glycogen synthase kinase 3 activity during development of bone marrow-derived dendritic cells (DCs) essential for the DC function to induce T helper 2 polarization. *Immunology* 122(2): 189-98.
- Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Dooijes, D., Klomp, L., Winoto, A., Georgopoulos, K., Meijlink, F., Clevers, H. (1991).** Cloning of murine TCF-1, a T cell-specific transcription factor interacting with functional motifs in the CD3-epsilon and T cell receptor alpha enhancers. *J Exp Med* 173(5): 1133-42.
- Ouchi, N., Higuchi, A., Ohashi, K., Oshima, Y., Gokce, N., Shibata, R., Akasaki, Y., Shimono, A., Walsh, K. (2010).** Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329(5990): 454-7.
- Palucka, K., Banchereau, J. (2012).** Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 12(4): 265-77.
- Pasare, C., Medzhitov, R. (2005).** Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 560: 11-8.
- Pastille, E., Didovic, S., Brauckmann, D., Rani, M., Agrawal, H., Schade, F.U., Zhang, Y., Flohe, S.B. (2011).** Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J Immunol* 186(2): 977-86.
- Pereira, C., Schaer, D.J., Bachli, E.B., Kurrer, M.O., Schoedon, G. (2008).** Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(3): 504-10.
- Polakis, P. (2012).** Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(5).
- Polzer, K., Diarra, D., Zwerina, J., Schett, G. (2008).** Inflammation and destruction of the joints--the Wnt pathway. *Joint Bone Spine* 75(2): 105-7.
- Popov, A., Abdullah, Z., Wickenhauser, C., Saric, T., Driesen, J., Hanisch, F.G., Domann, E., Raven, E.L., Dehus, O., Hermann, C., Eggle, D., Debey, S., Chakraborty, T., Kronke, M., Utermohlen, O., Schultze, J.L. (2006).** Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J Clin Invest* 116(12): 3160-70.
- Popov, A., Driesen, J., Abdullah, Z., Wickenhauser, C., Beyer, M., Debey-Pascher, S., Saric, T., Kummer, S., Takikawa, O., Domann, E., Chakraborty, T., Kronke, M., Utermohlen, O., Schultze, J.L. (2008).** Infection of myeloid dendritic cells with *Listeria monocytogenes* leads to the suppression of T cell function by multiple inhibitory mechanisms. *J Immunol* 181(7): 4976-88.
- Poulin, L.F., Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.L., Keller, A.M., Joffre, O., Zelenay, S., Nye, E., Le Moine, A., Faure, F., Donckier, V., Sancho, D., Cerundolo, V., Bonnet, D., Reis e Sousa, C. (2010).** Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 207(6): 1261-71.
- Pourreyron, C., Reilly, L., Proby, C., Panteleyev, A., Fleming, C., McLean, K., South, A.P., Foerster, J. (2012).** Wnt5a is strongly expressed at the leading edge in non-melanoma skin cancer, forming active gradients, while canonical Wnt signalling is repressed. *PLoS One* 7(2): e31827.
- Pukrop, T., Binder, C. (2008).** The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med (Berl)* 86(3): 259-66.

- Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trumper, L., Binder, C. (2006).** Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14): 5454-9.
- Ranheim, E.A., Kwan, H.C., Reya, T., Wang, Y.K., Weissman, I.L., Francke, U. (2005).** Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood* 105(6): 2487-94.
- Rankin, L., Belz, G.T. (2011).** Diverse roles of inhibitor of differentiation 2 in adaptive immunity. *Clin Dev Immunol* 2011: 281569.
- Rao, T.P., Kuhl, M. (2010).** An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 106(12): 1798-806.
- Rattis, F.M., Voermans, C., Reya, T. (2004).** Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol* 11(2): 88-94.
- Rauner, M., Stein, N., Winzer, M., Goettsch, C., Zwerina, J., Schett, G., Distler, J.H., Albers, J., Schulze, J., Schinke, T., Bornhauser, M., Platzbecker, U., Hofbauer, L.C. (2012).** WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production. *J Bone Miner Res* 27(3): 575-85.
- Reem, G.H., Yeh, N.H. (1984).** Interleukin 2 regulates expression of its receptor and synthesis of gamma interferon by human T lymphocytes. *Science* 225(4660): 429-30.
- Reid, S.D., Penna, G., Adorini, L. (2000).** The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 12(1): 114-21.
- Reis e Sousa, C. (2006).** Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6(6): 476-83.
- Reya, T., Clevers, H. (2005).** Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434(7035): 843-50.
- Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., Grosschedl, R. (2000).** Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13(1): 15-24.
- Ripka, S., Konig, A., Buchholz, M., Wagner, M., Sipos, B., Kloppel, G., Downward, J., Gress, T., Michl, P. (2007).** WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28(6): 1178-87.
- Rodionova, E., Conzelmann, M., Maraskovsky, E., Hess, M., Kirsch, M., Giese, T., Ho, A.D., Zoller, M., Dreger, P., Luft, T. (2007).** GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109(4): 1584-92.
- Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Cordeu, L., Vilas-Zornoza, A., San Jose-Eneriz, E., Garate, L., Castillejo, J.A., Martin, V., Prosper, F., Heiniger, A., Torres, A., Agirre, X. (2007).** WNT5A, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 43(18): 2736-46.
- Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994).** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179(4): 1109-18.
- Sancho, D., Mourao-Sa, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., Reis e Sousa, C. (2008).** Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 118(6): 2098-110.
- Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H., Kikuchi, A. (2010).** Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *Embo J* 29(1): 41-54.
- Sato, K., Yamashita, N., Matsuyama, T. (2002).** Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4(+) and CD8(+) T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell Immunol* 215(2): 186-94.

- Scott, C.L., Aumeunier, A.M., Mowat, A.M. (2011).** Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol* 32(9): 412-9.
- Schaale, K., Neumann, J., Schneider, D., Ehlers, S., Reiling, N. (2011).** Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. *Eur J Cell Biol* 90(6-7): 553-9.
- Schmidt, S.V., Nino-Castro, A.C., Schultze, J.L. (2012).** Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol* 3: 274.
- Schreibelt, G., Klinkenberg, L.J., Cruz, L.J., Tacke, P.J., Tel, J., Kreutz, M., Adema, G.J., Brown, G.D., Figdor, C.G., de Vries, I.J. (2012).** The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* 119(10): 2284-92.
- Schulte, D.M., Muller, N., Neumann, K., Oberhauser, F., Faust, M., Gudelhofer, H., Brandt, B., Krone, W., Laudes, M. (2012).** Pro-inflammatory wnt5a and anti-inflammatory sFRP5 are differentially regulated by nutritional factors in obese human subjects. *PLoS One* 7(2): e32437.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., Pabst, O. (2009).** Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* 206(13): 3101-14.
- Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M.H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., Amigorena, S. (2012).** Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 209(4): 653-60.
- Sen, M. (2005).** Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44(6): 708-13.
- Sen, M., Chamorro, M., Reifert, J., Corr, M., Carson, D.A. (2001).** Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum* 44(4): 772-81.
- Sen, M., Lauterbach, K., El-Gabalawy, H., Firestein, G.S., Corr, M., Carson, D.A. (2000).** Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(6): 2791-6.
- Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., Kupper, T.S. (2012).** Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 36(5): 873-84.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., Pamer, E.G. (2008).** Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26: 421-52.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., Pamer, E.G. (2003).** TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19(1): 59-70.
- Shaw, J., Wang, Y.H., Ito, T., Arima, K., Liu, Y.J. (2010).** Plasmacytoid dendritic cells regulate B-cell growth and differentiation via CD70. *Blood* 115(15): 3051-7.
- Staal, F.J., Clevers, H.C. (2005).** WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 5(1): 21-30.
- Staal, F.J., Luis, T.C. (2010).** Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem* 109(5): 844-9.
- Staal, F.J., Luis, T.C., Tiemessen, M.M. (2008).** WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* 8(8): 581-93.
- Staal, F.J., Sen, J.M. (2008).** The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *Eur J Immunol* 38(7): 1788-94.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C. (2003).** Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711.

- Stoitzner, P., Tripp, C.H., Eberhart, A., Price, K.M., Jung, J.Y., Bursch, L., Ronchese, F., Romani, N. (2006).** Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(20): 7783-8.
- Tacke, F., Randolph, G.J. (2006).** Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211(6-8): 609-18.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., He, X. (2000).** LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407(6803): 530-5.
- Teteris, S.A., Engel, D.R., Kurts, C. (2011).** Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney Int* 80(2): 139-45.
- Thiele, A., Wasner, M., Muller, C., Engeland, K., Hauschildt, S. (2001).** Regulation and possible function of beta-catenin in human monocytes. *J Immunol* 167(12): 6786-93.
- Tickenbrock, L., Schwable, J., Strey, A., Sargin, B., Hehn, S., Baas, M., Choudhary, C., Gerke, V., Berdel, W.E., Muller-Tidow, C., Serve, H. (2006).** Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes. *J Leukoc Biol* 79(6): 1306-13.
- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., Yang, Y. (2003).** Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol* 162(5): 899-908.
- Torres-Aguilar, H., Aguilar-Ruiz, S.R., Gonzalez-Perez, G., Munguia, R., Bajana, S., Meraz-Rios, M.A., Sanchez-Torres, C. (2009).** Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J Immunol* 184(4): 1765-75.
- Torres-Aguilar, H., Aguilar-Ruiz, S.R., Gonzalez-Perez, G., Munguia, R., Bajana, S., Meraz-Rios, M.A., Sanchez-Torres, C. (2010).** Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J Immunol* 184(4): 1765-75.
- Trombetta, E.S., Mellman, I. (2005).** Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028.
- Ueno, H., Schmitt, N., Klechevsky, E., Pedroza-Gonzalez, A., Matsui, T., Zurawski, G., Oh, S., Fay, J., Pascual, V., Banchereau, J., Palucka, K. (2010).** Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev* 234(1): 199-212.
- Valencia, J., Hernandez-Lopez, C., Martinez, V.G., Hidalgo, L., Zapata, A.G., Vicente, A., Varas, A., Sacedon, R. (2010).** Transient beta-catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34+CD1a- progenitors. *J Leukoc Biol* 87(3): 405-14.
- Valenta, T., Hausmann, G., Basler, K. (2012).** The many faces and functions of beta-catenin. *Embo J* 31(12): 2714-36.
- Valladeau, J., Saeland, S. (2005).** Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 17(4): 273-83.
- van Amerongen, R.** Alternative wnt pathways and receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(10).
- van Amerongen, R. (2012).** Alternative wnt pathways and receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(10).
- van Amerongen, R., Nusse, R. (2009).** Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136(19): 3205-14.
- van de Laar, L., Coffey, P.J., Woltman, A.M. (2012).** Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119(15): 3383-93.
- Van Den Berg, D.J., Sharma, A.K., Bruno, E., Hoffman, R. (1998).** Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood* 92(9): 3189-202.

- Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204(1): 171-80.
- Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H.R., Clevers, H. (1995). An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* 374(6517): 70-4.
- Villadangos, J.A., Shortman, K. (2010). Found in translation: the human equivalent of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med* 207(6): 1131-4.
- von Bergwelt-Baildon, M.S., Popov, A., Saric, T., Chemnitz, J., Classen, S., Stoffel, M.S., Fiore, F., Roth, U., Beyer, M., Debey, S., Wickenhauser, C., Hanisch, F.G., Schultze, J.L. (2006). CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* 108(1): 228-37.
- Wakim, L.M., Waithman, J., van Rooijen, N., Heath, W.R., Carbone, F.R. (2008). Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science* 319(5860): 198-202.
- Wan, Y.Y. (2010). Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 130(2): 166-71.
- Wan, Y.Y., Flavell, R.A. (2009). How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* 1(1): 20-36.
- Wang, H., Brown, J., Garcia, C.A., Tang, Y., Benakanakere, M.R., Greenway, T., Alard, P., Kinane, D.F., Martin, M. (2011). The role of glycogen synthase kinase 3 in regulating IFN-beta-mediated IL-10 production. *J Immunol* 186(2): 675-84.
- Wang, I.M., Contursi, C., Masumi, A., Ma, X., Trinchieri, G., Ozato, K. (2000). An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages. *J Immunol* 165(1): 271-9.
- Wang, M.J., Huang, H.Y., Chen, W.F., Chang, H.F., Kuo, J.S. (2010). Glycogen synthase kinase-3beta inactivation inhibits tumor necrosis factor-alpha production in microglia by modulating nuclear factor kappaB and MLK3/JNK signaling cascades. *J Neuroinflammation* 7: 99.
- Wend, P., Holland, J.D., Ziebold, U., Birchmeier, W. (2010). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 21(8): 855-63.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423(6938): 448-52.
- Willert, K., Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(9): a007864.
- Wolfe, S.J., Strebovsky, J., Bartz, H., Sahr, A., Arnold, C., Kaiser, C., Dalpke, A.H., Heeg, K. (2011). PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur J Immunol* 41(2): 413-24.
- Woollard, K.J., Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 7(2): 77-86.
- Wouda, R.R., Bansraj, M.R., de Jong, A.W., Noordermeer, J.N., Fradkin, L.G. (2008). Src family kinases are required for WNT5 signaling through the Derailed/RYK receptor in the Drosophila embryonic central nervous system. *Development* 135(13): 2277-87.
- Wu, B., Crompton, S.P., Hughes, C.C. (2007). Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26(2): 227-39.
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P.M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M.W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K., Nathans, J. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116(6): 883-95.

- Xu, Y., Zhan, Y., Lew, A.M., Naik, S.H., Kershaw, M.H. (2007).** Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 179(11): 7577-84.
- Xue, H.H., Zhao, D.M. (2012).** Regulation of mature T cell responses by the Wnt signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1247: 16-33.
- Yamamoto, H., Oue, N., Sato, A., Hasegawa, Y., Yamamoto, H., Matsubara, A., Yasui, W., Kikuchi, A. (2010).** Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* 29(14): 2036-46.
- Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., Sasaki, H. (2008).** Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell* 15(1): 23-36.
- Ying, J., Li, H., Chen, Y.W., Srivastava, G., Gao, Z., Tao, Q. (2007).** WNT5A is epigenetically silenced in hematologic malignancies and inhibits leukemia cell growth as a tumor suppressor. *Blood* 110(12): 4130-2.
- Yu, Q., Sharma, A., Ghosh, A., Sen, J.M. (2011).** T cell factor-1 negatively regulates expression of IL-17 family of cytokines and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 186(7): 3946-52.
- Yu, Q., Sharma, A., Oh, S.Y., Moon, H.G., Hossain, M.Z., Salay, T.M., Leeds, K.E., Du, H., Wu, B., Waterman, M.L., Zhu, Z., Sen, J.M. (2009).** T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon-gamma. *Nat Immunol* 10(9): 992-9.
- Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Steinman, R.M., Krueger, J.G., Lowes, M.A. (2007).** Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages. *J Clin Invest* 117(9): 2517-25.
- Zanotti, S., Kumar, A., Kumar, A. (2002).** Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs* 11(8): 1061-75.
- Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., Reis e Sousa, C. (2012).** The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest* 122(5): 1615-27.
- Zenke, M., Hieronymus, T. (2006).** Towards an understanding of the transcription factor network of dendritic cell development. *Trends Immunol* 27(3): 140-5.
- Zhan, Y., Xu, Y., Lew, A.M. (2012).** The regulation of the development and function of dendritic cell subsets by GM-CSF: more than a hematopoietic growth factor. *Mol Immunol* 52(1): 30-7.
- Zhan, Y., Xu, Y., Seah, S., Brady, J.L., Carrington, E.M., Cheers, C., Croker, B.A., Wu, L., Villadangos, J.A., Lew, A.M. (2010).** Resident and monocyte-derived dendritic cells become dominant IL-12 producers under different conditions and signaling pathways. *J Immunol* 185(4): 2125-33.
- Zhang, X., Abreu, J.G., Yokota, C., MacDonald, B.T., Singh, S., Coburn, K.L., Cheong, S.M., Zhang, M.M., Ye, Q.Z., Hang, H.C., Steen, H., He, X. (2012).** Tiki1 is required for head formation via Wnt cleavage-oxidation and inactivation. *Cell* 149(7): 1565-77.
- Zhao, D.M., Yu, S., Zhou, X., Haring, J.S., Held, W., Badovinac, V.P., Harty, J.T., Xue, H.H. (2010).** Constitutive activation of Wnt signaling favors generation of memory CD8 T cells. *J Immunol* 184(3): 1191-9.
- Zhou, J., Cheng, P., Youn, J.I., Cotter, M.J., Gabilovich, D.I. (2009).** Notch and wingless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation. *Immunity* 30(6): 845-59.
- Zhou, L.J., Tedder, T.F. (1996).** CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2588-92.

**Zhu, Y., Shen, T., Liu, J., Zheng, J., Zhang, Y., Xu, R., Sun, C., Du, J., Chen, Y., Gu, L. (2013).** Rab35 is required for Wnt5a/Dvl2-induced Rac1 activation and cell migration in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Signal*.

## **SUMMARY**

## Introduction

Dendritic cells (DCs) play a central role orchestrating adaptive immune responses against pathogens or cancer while maintaining tolerance to self antigens and innocuous micro-organisms or molecules. These dual-antagonistic functions are balanced by microenvironment that affects developing DCs or signals received during DC activation. This milieu determines DC functional diversity, allowing the organization of discrete DC subpopulations in different anatomical compartments, which present specific immunological requirements, adapting their activities to the organism's state (*Naik 2008; Coquerelle and Moser 2010; Ueno et al. 2010*). Growing evidence points to Wnt proteins and Wnt signalling components as important modulators of immune system that participate in the balance between tolerance and immunity and reveal DCs as one of their direct targets (*Jiang et al. 2007; Zhou et al. 2009; Manicassamy et al. 2010*).

Wnt proteins are a large family of secreted proteins widely expressed during development when they are implicated in an enormous array of processes (*van Amerongen and Nusse 2009*). In adults, Wnt proteins regulate stem cell renewal and differentiation, modulate bone remodelling (*Hoepfner et al. 2009*), adipose tissue homeostasis (*Ouchi et al. 2010*) and haematopoiesis (*Staal and Luis 2010*). In addition, Wnt signalling deregulation is associated with cancer (*Wend et al. 2010*). Wnt proteins have also been proposed as endocrine factors involved in aging (*Brack et al. 2007; Liu et al. 2007*) and septicaemia (*Pereira et al. 2008*).

To trigger a cellular response, a single Wnt ligand can simultaneously activate distinct signalling pathways (*Gao and Chen 2010; Rao and Kuhl 2010*). Ultimate Wnt signalling output, and biological consequences, depends on both Wnt ligand and receptor context. Canonical signalling is initiated through a multimeric cluster of LRP5/6 and Frizzled (Fzd) receptors that recruit to the membrane dishevelled (Dsv), Axin and GSK3 cytoplasmic proteins. This results in LRP phosphorylation and disassembly of the  $\beta$ -catenin destruction complex, preventing  $\beta$ -catenin constitutive phosphorylation by GSK3 and its subsequent proteolytic destruction. Ultimately,  $\beta$ -catenin accumulates in the nucleus turning out the transcription of Wnt target genes. Non canonical signalling occurs independently of  $\beta$ -catenin stabilization. Fzd-activated Dsv can associate with small GTPases including Rac, Cdc42 and Rho. They in turn activate ROCK kinase and JNK, which remodel cytoskeleton and promote c-Jun regulated cell expression. Fzd receptor through Dsv can also signal via G-proteins inducing  $\text{Ca}^{2+}$  flux that activates calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), PKC and subsequently nuclear factor of activated T cells (NFAT) (*Gao and Chen 2010; Rao and Kuhl 2010*).

Different components of Wnt pathway have immunomodulatory properties being possible targets for therapeutic intervention. GSK3 inhibition has a global anti-inflammatory effect, negatively affecting to innate and adaptive immune responses (*Beurel et al. 2010; Beurel et al. 2011*). Endothelial cell-derived Wnts activate  $\beta$ -catenin dependent pathway, necessary for optimal effector T cell transmigration (*Wu et al. 2007*), while inflammation makes macrophages sensitive to Wnt3a, which in turn reduces their pro-inflammatory effectors mechanisms (*Neumann et al. 2010*). On the other hand, Wnt5a, considered a prototype of non canonical Wnt protein, has been proposed as a pro-inflammatory signal involved in macrophage and endothelial activation (*Blumenthal et al. 2006; Pereira et al. 2008; Kim et al. 2010*), being implicated in rheumatoid arthritis pathogenesis (*Sen 2005*) and detected in other human inflammatory diseases such as granulomatous lesions from patients infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*Blumenthal et al. 2006*), atherosclerotic plaques (*Kim et al. 2010*), lesions of psoriasis patients (*Gudjonsson et al. 2010*) and in the sera from patients with sepsis (*Pereira et al. 2008*). In addition, the expression of Wnt5a is correlated with the aggressiveness of melanoma (*O'Connell et al. 2008*), as well as breast (*Pukrop et al. 2006*), lung (*Huang et al. 2005*), gastric (*Kurayoshi et al. 2006*) and prostate cancer (*Yamamoto et al. 2010*).

Several studies have revealed that DCs are important targets for the immunomodulatory activity of Wnt signalling. Cooperation of canonical Wnt pathway with Notch signalling is required for the differentiation of haematopoietic progenitor cells (HPCs) into DCs, while activation of non canonical Wnt pathway decreases yielded DCs from HPC cultures and reduces also their allogenic capacity (*Zhou et al. 2009*). It has been also demonstrated that GSK3 activity profoundly influences DC differentiation and maturation. GSK3 inhibits the differentiation of monocytes into macrophages allowing DC differentiation. In immature monocyte-derived DCs (moDCs) this enzyme is constitutively active suppressing spontaneous maturation and enhancing cytokine production after CD40L or *E.coli* dependent activation (*Rodionova et al. 2007*). Consistent with these observations, inhibition of GSK3 activity or activation of  $\beta$ -catenin pathway through disruption of E-cadherin-mediated adhesion in immature DCs induces a semi-mature tolerogenic phenotype which could correlate with the functional characteristics of the migratory DCs that reach lymph nodes in steady-state (*Jiang et al. 2007*). More recently, Manicassamy et al (*Manicassamy et al. 2010*) revealed a role for  $\beta$ -catenin in the balance between immunity and tolerance in murine intestinal mucosa. Intestinal lamina propria DCs expressed Wnt ligands and Fzd receptors, and Wnt-mediated activation of  $\beta$ -catenin programs them to induce Treg cells (*Manicassamy et al. 2010*).

However, until now there are no studies about the direct effect of Wnt proteins on moDC differentiation and maturation. Therefore, in the present study we analyse the effect of Wnt proteins addition during human moDCs differentiation and during their stimulation.

### **Objective**

In the present work we will analyse

- the expression of Wnt receptors during the life cycle of human moDCs
- the effect of increasing Wnt signalling during moDC differentiation
- the role Wnt5a signalling during DC maturation
- the expression of non canonical Wnt ligands during the life cycle of DCs
- the function of non canonical Wnt5a produced by stimulated DCs on their maturation and T cell function

### **Material & Methods**

Immature DCs were obtained from human CD14<sup>+</sup> monocytes cultured with GM-CSF and IL-4 during 6 days in the presence or absence of 100 ng/ml of Wnt3a (Wnt3a-DCs) or Wnt5a (Wnt5a-DCs). At day 6 of culture immature DCs were washed to remove Wnt proteins and cytokines, and stimulated for 24 to 48 hours with different TLR agonists.

Changes during DC differentiation and maturation in the pattern of expression of non canonical Wnt ligands and their receptors were determined by PCRq. The DC phenotype and their endocytic capabilities were determined by flow cytometric analysis. DC function was analysed measuring cytokine levels after 24-48 hours of stimulation with TLR agonists in culture supernatants by ELISA. Moreover, stimulated DCs were cultured in MLR with naive CD4<sup>+</sup> T cells to analyse their allostimulatory capacity. We also analyse by PCRq the TLR expression pattern and several transcriptional regulators on Wnt-DCs and during their early differentiation.

To analyse the signalling mechanism by which Wnt5a alters DC differentiation, monocyte cultures were treated with Wnt5a alone or Wnt5a plus specific signalling inhibitor molecules only during the first 24 hours of culture. The production of Wnt5a by DCs was silenced by nucleofection with specific pre-designed siRNAs. CD4 naive T cell activation cultures were performed to study the effect of DC-derived Wnt5a on these cells.

## Results

Our results show that Wnt receptors are expressed during the life cycle of human moDCs and during their stimulation with different TLR ligands. Monocytes show low levels of mRNA transcripts of Fzd and non conventional Wnt receptors. This transcription profile changes profoundly during DC differentiation and maturation, suggesting that Wnt signalling may have a role on these processes.

The increase in Wnt5a signalling during the differentiation of human moDCs alters their phenotype and compromises their subsequent capacity to mature in response to TLR-dependent stimuli. These Wnt5a-DCs produce scant amounts of IL-12 and TNF $\alpha$  but increased levels of IL-10. Consequently, Wnt5a-DCs have a reduced capacity to induce Th1 responses promoting IL-10 secretion by CD4 T cells.

Changes in transcriptional profile of Wnt5a-DCs correlate with their dysfunctional phenotype presumably caused by increased IL-6/IL-10 signalling during the process of DC differentiation. Hyporesponsiveness of Wnt5a-DCs to stimuli via TLR could underlie part of their functional defects. However, although Wnt5a-DCs show lower expression of TLR3, 4 and 5 than control DCs, we found normal or higher levels of TLR1, TLR2, TLR6 and TLR8 transcripts. The analysis of mRNA levels for several transcriptional regulators revealed that Wnt5a-DCs expressed lower levels of ID2 and IRF8 and higher levels of ID3 and SOCS3. In addition, Wnt5a-DCs failed to properly increase IRF1 and IRF8 transcription after stimulation, two positive and essential factors for priming IL-12 secretion (*Liu et al. 2005*). The higher expression of SOCS3 observed in Wnt5a-DCs can interfere with their stimulation since abrogates cytokine Jak-Stat signal transduction pathway (*Dimitriou et al. 2008*). In analogy with our results, SOCS3 over-expressing DCs secrete low amounts of IL-12 but high levels of IL-10 and show a tolerogenic phenotype (*Li et al. 2006*).

During the first hours of monocyte culture, GM-CSF/IL4 signalling triggers a genetic program which leads to DC development. Our results show that Wnt5a diminishes the response of monocytes to GM-CSF/IL4 reducing STAT5 and STAT6 phosphorylation. Moreover, we find that Wnt5a treatment modifies the expression of some regulatory proteins and transcription factors critical for DC differentiation, like SOCS3 whose expression is induced by Wnt5a during first hours of monocyte culture. SOCS3 expression has been proven to be induced by different cytokines including IL-6 and IL-10 (*Dimitriou et al. 2008*) which were increased during DC differentiation in the presence of Wnt5a. High IL-10 signalling during DC differentiation could be also one of the causes for increased ID3 expression in Wnt5a-DCs which in turn would account for the higher capacity of Wnt5a-DCs for secreting IL-10, because it has been proven

that IL-10 signalling increases ID3 expression and ID3 overexpression enhanced IL-10 production in monocytes (*Kuo et al. 2011*).

In our cultures, Wnt5a does not increase  $\beta$ -catenin over control values, rather; on the contrary, we observed that it causes a slight decrease. Alternatively to canonical  $\beta$ -catenin dependent pathway, our current results indicate that monocytes respond to Wnt5a through non canonical  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pathway increasing CaMKII activity and NF- $\kappa$ B.

In addition, Wnt5a is the main non canonical Wnt protein expressed by moDC,s and TLR signalling stimulates its production. Nevertheless, Wnt5a alone is not able to induce DC phenotypic maturation or cytokine secretion but improves their endocytic capability. Moreover, in response to LPS pre-treated Wnt5a-DCs secrete higher levels of IL-12 but lower of IL-10, and MLR assays show lower production of IL-10 by naive T cells primed with pre-treated Wnt5a-DCs. The addition of Wnt5a during LPS induced maturation also increases IL-12 secretion and reduces that of IL-10, but its impact on DC allostimulatory capabilities is irrelevant suggesting a main role for autocrine Wnt5a. Accordingly, Wnt5a-silenced DCs show a reduced viability and fail to produce IL-12 while the secretion of IL-10 is increased. Consequently, these Wnt5a-silenced DCs show a reduced capacity to induce Th1 responses promoting IL-10 secretion by naive CD4 T cells. This situation is rescued by the addition of Wnt5a.

This effect is not only an autocrine consequence of the absence of Wnt5a on stimulated DCs function, but also a paracrine effect on T cell function. Our results show that human naive CD4<sup>+</sup> T cells express Wnt receptors and that their expression decrease during T cell stimulation via CD3/CD28. Additionally, the increase of Wnt5a signalling has a positive role on IL-2/IL-2R $\alpha$  signalling, increases the number of IFN $\gamma$  producer cells and IFN $\gamma$  secretion, but does not modify CD4<sup>+</sup> T cell proliferation.

### **Conclusions**

Our results show that monocytes and moDCs can respond to Wnt signals. During the life cycle of moDCs, Wnt proteins are expressed and Wnt5a is the main non canonical Wnt ligand expressed by moDCs. Moreover, Wnt5a production is notably increased by TLR induced stimulation. Under high levels of Wnt5a, typical of inflammatory state and sepsis, monocytes could differentiate into dysfunctional DCs with tolerogenic features. However, Wnt5a has a positive and necessary function on immature and mature DCs suggesting a timing-dependent dual role for Wnt5a on human moDCs.

- Beurel, E., Michalek, S.M., Jope, R.S. (2010).** Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol* 31(1): 24-31.
- Beurel, E., Yeh, W.I., Michalek, S.M., Harrington, L.E., Jope, R.S. (2011).** Glycogen synthase kinase-3 is an early determinant in the differentiation of pathogenic Th17 cells. *J Immunol* 186(3): 1391-8.
- Blumenthal, A., Ehlers, S., Lauber, J., Buer, J., Lange, C., Goldmann, T., Heine, H., Brandt, E., Reiling, N. (2006).** The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108(3): 965-73.
- Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., Rando, T.A. (2007).** Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317(5839): 807-10.
- Coquerelle, C., Moser, M. (2010).** DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* 234(1): 317-34.
- Dimitriou, I.D., Clemenza, L., Scotter, A.J., Chen, G., Guerra, F.M., Rottapel, R. (2008).** Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol Rev* 224: 265-83.
- Gao, C., Chen, Y.G. (2010).** Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22(5): 717-27.
- Gudjonsson, J.E., Johnston, A., Stoll, S.W., Riblett, M.B., Xing, X., Kochkodan, J.J., Ding, J., Nair, R.P., Aphale, A., Voorhees, J.J., Elder, J.T. (2010).** Evidence for altered Wnt signaling in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 130(7): 1849-59.
- Hoepfner, L.H., Secreto, F.J., Westendorf, J.J. (2009).** Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin Ther Targets* 13(4): 485-96.
- Huang, C.L., Liu, D., Nakano, J., Ishikawa, S., Kontani, K., Yokomise, H., Ueno, M. (2005).** Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23(34): 8765-73.
- Jiang, A., Bloom, O., Ono, S., Cui, W., Unternaehrer, J., Jiang, S., Whitney, J.A., Connolly, J., Banchemreau, J., Mellman, I. (2007).** Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27(4): 610-24.
- Kim, J., Kim, J., Kim, D.W., Ha, Y., Ihm, M.H., Kim, H., Song, K., Lee, I. (2010).** Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. *J Immunol* 185(2): 1274-82.
- Kuo, P.L., Hung, J.Y., Huang, S.K., Chou, S.H., Cheng, D.E., Jong, Y.J., Hung, C.H., Yang, C.J., Tsai, Y.M., Hsu, Y.L., Huang, M.S. (2011).** Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway. *J Immunol* 186(3): 1521-30.
- Kurayoshi, M., Oue, N., Yamamoto, H., Kishida, M., Inoue, A., Asahara, T., Yasui, W., Kikuchi, A. (2006).** Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* 66(21): 10439-48.
- Li, Y., Chu, N., Rostami, A., Zhang, G.X. (2006).** Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J Immunol* 177(3): 1679-88.
- Liu, H., Fergusson, M.M., Castilho, R.M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, D., Rovira, II, Schimel, D., Kuo, C.J., Gutkind, J.S., Hwang, P.M., Finkel, T. (2007).** Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 317(5839): 803-6.

- Liu, J., Cao, S., Kim, S., Chung, E.Y., Homma, Y., Guan, X., Jimenez, V., Ma, X. (2005).** Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr Immunol Rev* 1(2): 119-137.
- Manicassamy, S., Reizis, B., Ravindran, R., Nakaya, H., Salazar-Gonzalez, R.M., Wang, Y.C., Pulendran, B. (2010).** Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science* 329(5993): 849-53.
- Naik, S.H. (2008).** Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* 86(5): 439-52.
- Neumann, J., Schaale, K., Farhat, K., Endermann, T., Ulmer, A.J., Ehlers, S., Reiling, N. (2010).** Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Faseb J* 24(11): 4599-612.
- O'Connell, M.P., French, A.D., Leotlela, P.D., Weeraratna, A.T. (2008).** Assaying Wnt5A-mediated invasion in melanoma cells. *Methods Mol Biol* 468: 243-53.
- Ouchi, N., Higuchi, A., Ohashi, K., Oshima, Y., Gokce, N., Shibata, R., Akasaki, Y., Shimono, A., Walsh, K. (2010).** Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329(5990): 454-7.
- Pereira, C., Schaer, D.J., Bachli, E.B., Kurrer, M.O., Schoedon, G. (2008).** Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(3): 504-10.
- Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, T., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., Trumper, L., Binder, C. (2006).** Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14): 5454-9.
- Rao, T.P., Kuhl, M. (2010).** An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 106(12): 1798-806.
- Rodionova, E., Conzelmann, M., Maraskovsky, E., Hess, M., Kirsch, M., Giese, T., Ho, A.D., Zoller, M., Dreger, P., Luft, T. (2007).** GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109(4): 1584-92.
- Sen, M. (2005).** Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44(6): 708-13.
- Staal, F.J., Luis, T.C. (2010).** Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem* 109(5): 844-9.
- Ueno, H., Schmitt, N., Klechevsky, E., Pedroza-Gonzalez, A., Matsui, T., Zurawski, G., Oh, S., Fay, J., Pascual, V., Banchereau, J., Palucka, K. (2010).** Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev* 234(1): 199-212.
- van Amerongen, R., Nusse, R. (2009).** Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136(19): 3205-14.
- Wend, P., Holland, J.D., Ziebold, U., Birchmeier, W. (2010).** Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 21(8): 855-63.
- Wu, B., Crampton, S.P., Hughes, C.C. (2007).** Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26(2): 227-39.
- Yamamoto, H., Oue, N., Sato, A., Hasegawa, Y., Yamamoto, H., Matsubara, A., Yasui, W., Kikuchi, A. (2010).** Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene* 29(14): 2036-46.
- Zhou, J., Cheng, P., Youn, J.I., Cotter, M.J., Gabilovich, D.I. (2009).** Notch and wingless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation. *Immunity* 30(6): 845-59.

**ANEXO**

# Wnt5a Skews Dendritic Cell Differentiation to an Unconventional Phenotype with Tolerogenic Features

Jaris Valencia,\* Carmen Hernández-López,\* Víctor G. Martínez,\* Laura Hidalgo,\* Agustín G. Zapata,<sup>†</sup> Ángeles Vicente,\* Alberto Varas,\*<sup>1</sup> and Rosa Sacedón\*<sup>1</sup>

Dendritic cells (DCs) are critical regulators of immune responses that integrate signals from the innate and adaptive immune system and orchestrate T cell responses toward either immunity or tolerance. Growing evidence points to the Wnt signaling pathway as a pivotal piece in the immune balance and focuses on DCs as a direct target for their immunoregulatory role. Our results show that the increase in Wnt5a signaling during the differentiation of human DCs from monocytes alters their phenotype and compromises their subsequent capacity to mature in response to TLR-dependent stimuli. These Wnt5a-DCs produce scant amounts of IL-12p70 and TNF- $\alpha$  but increased levels of IL-10. Consequently, these Wnt5a-DCs have a reduced capacity to induce Th1 responses that promote IL-10 secretion by CD4 T cells. Changes in the transcriptional profile of Wnt5a-DCs correlate with their unconventional phenotype caused presumably by increased IL-6/IL-10 signaling during the process of DC differentiation. The effect of Wnt5a is not a consequence of  $\beta$ -catenin accumulation but is dependent on noncanonical Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II/NF- $\kappa$ B signaling. Our results therefore suggest that under high levels of Wnt5a, typical of the inflammatory state and sepsis, monocytes could differentiate into unconventional DCs with tolerogenic features. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 4129–4139.

Dendritic cells (DCs) play a central role orchestrating adaptive immune responses against pathogens or cancer while maintaining tolerance to self Ags and innocuous micro-organisms or molecules. These dual-antagonistic functions are balanced by a microenvironment that affects developing DCs or signals received during DC activation. This milieu determines DC functional diversity and allows the organization of discrete DC subpopulations into different anatomical compartments, which present specific immunological requirements, and adaptation of their activities to the organism's state (1–3). Recent growing evidence points to Wnt proteins and Wnt signaling components as important modulators of the immune system that participate in the balance between tolerance and immunity and reveal DCs as one of their direct targets (4–6).

Wnt proteins are a large family of secreted proteins widely expressed during development when they are implicated in an

enormous array of processes (7). In adults, Wnt proteins regulate stem cell renewal and differentiation and modulate bone remodeling (8), adipose (9), and tissue homeostasis and hematopoiesis (10), and Wnt signaling deregulation is associated with cancer (11). Wnt proteins also have been proposed as endocrine factors involved in aging (12, 13) and septicemia (14).

To trigger a cellular response, a single Wnt ligand can simultaneously activate distinct signaling pathways (15, 16). Ultimate Wnt signaling output and biological consequences depend on both the Wnt ligand and the receptor context. Canonical signaling is initiated through a multimeric cluster of low-density receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) and Frizzled (Fzd) receptors that recruit the cytoplasmic proteins dishevelled, axin, and glycogen synthase kinase 3 (GSK3) to the membrane. This results in LRP phosphorylation and disassembly of the  $\beta$ -catenin destruction complex, thus preventing constitutive phosphorylation of  $\beta$ -catenin by GSK3 and its subsequent proteolytic destruction. Ultimately,  $\beta$ -catenin accumulates in the nucleus and activates the transcription of Wnt target genes. In parallel to  $\beta$ -catenin transcriptional activity, canonical signaling also may influence a wider range of metabolic and signaling pathways through its inhibitory effect on GSK3 activity (17). Noncanonical signaling occurs independently of  $\beta$ -catenin stabilization. Fzd-activated dishevelled can associate with small GTPases, including Rac, Cdc42, and Rho. They in turn activate ROCK kinase and JNK, which remodel the cytoskeleton and promote c-Jun-regulated cell expression. Fzd–LRP receptor complexes also can signal via G proteins, which induce Ca<sup>2+</sup> flux that activates calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), protein kinase C (PKC), and subsequently NF-AT. CaMKII can lead to the activation of a nemo-like kinase, which may interfere with  $\beta$ -catenin transcriptional activity (15, 16). Different components of the Wnt pathway have immunomodulatory properties and are possible targets for therapeutic intervention. GSK3 inhibition has a global anti-inflammatory effect and negatively affects innate and adaptive immune responses (18, 19). Endothelial cell-derived Wnt proteins activate the  $\beta$ -catenin-dependent pathway necessary for optimal effector T cell transmigration (20), while inflammation makes macrophages sensitive

\*Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; and <sup>†</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

<sup>1</sup>A.V. and R.S. contributed equally to this work.

Received for publication May 2, 2011. Accepted for publication August 5, 2011.

This work was supported by Grants BFU2009-10315 and BFU2010-18250 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, RD06/0010/0003 from Carlos III Health Institute, and GR35/10A-910552 from Complutense University and Autonomous Community of Madrid.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Rosa Sacedón, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: rosasacedon@med.ucm.es

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CaMKII, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II; CBA, Cytometric Bead Array; DC, dendritic cell; Fzd, Frizzled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; ID, inhibitor of DNA binding; iDC, immature dendritic cell; IRF, IFN regulatory factor; LRP, low-density receptor-related protein; MFI, mean fluorescence intensity; PDL, programmed cell death ligand; PKC, protein kinase C; poly I:C, polyinosinic-polycytidylic acid; SOCS, suppressors of cytokine signaling.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

to Wnt3a, which in turn reduces their proinflammatory effector mechanisms (21). However, Wnt5a, considered a prototypical non-canonical Wnt protein, has been proposed as a proinflammatory signal involved in macrophage (14, 22) and endothelial (23) activation, implicated in rheumatoid arthritis pathogenesis (24), and detected in other human inflammatory diseases (22, 23).

Several studies have revealed that DCs are important targets for the immunomodulatory activity of Wnt signaling. Cooperation of the canonical Wnt pathway with Notch signal is required for the differentiation of hematopoietic progenitor cells into DCs (5). It also has been demonstrated that GSK3 activity profoundly influences DC differentiation and maturation. GSK3 inhibits the differentiation of monocytes into macrophages, thus allowing DC differentiation. In immature monocyte-derived DCs, this enzyme is constitutively active suppressing spontaneous maturation and enhancing cytokine production after CD40L- or *Escherichia coli*-dependent activation (25). Consistent with these observations, inhibition of GSK3 activity or activation of the  $\beta$ -catenin pathway through the disruption of E-cadherin-mediated adhesion in immature DCs (iDCs) induces a semimature tolerogenic phenotype that could correlate with the functional characteristics of the migratory DCs that reach lymph nodes in the steady state (4). More recently, Manicassamy et al. (6) revealed a role for  $\beta$ -catenin in the balance between immunity and tolerance in murine intestinal mucosa. Intestinal lamina propria DCs expressed Wnt ligands and Fzd receptors, and Wnt-mediated activation of  $\beta$ -catenin programs them to induce regulatory T cells (6).

In the present study, we show that Wnt5a impairs human monocyte-derived DC differentiation. DCs that differentiate in the presence of exogenous Wnt5a (Wnt5a-DCs) show basic phenotypic features of DCs but upon TLR stimulation produce scant amounts of IL-12 and TNF- $\alpha$  but higher amounts of IL-10. Consequently, these Wnt5a-DCs have a reduced capacity to induce Th1 responses that promote IL-10 secretion. We also observed that Wnt5a-DCs showed an altered transcription profile suggestive of their unconventional phenotype, focusing our interest on the signaling mechanisms by which Wnt5a alters DC differentiation.

## Materials and Methods

### Human monocyte differentiation

Human CD14<sup>+</sup> monocytes were isolated from buffy coats (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain) by density gradient centrifugation and immunomagnetic cell separation using anti-CD14-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes (>95%) were cultured in 48-well plates at a density of  $1 \times 10^6$  cells per milliliter in AIMV medium supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma-Spain), 20 ng/ml GM-CSF, and 20 ng/ml IL-4 (both from Invitrogen, Carlsbad, CA), in the presence or absence of 100 ng/ml Wnt3a or Wnt5a (both from Chemicon International, Temecula, CA) for 6 d. One half of the medium was replaced every 2 d. In some experiments, GM-CSF/IL-4 monocyte cultures were treated with Wnt5a alone or Wnt5a plus specific signaling inhibitor molecules only during the first 24 h of culture, when total medium from the cultures was substituted for 24 h GM-CSF/IL-4 monocyte-conditioned medium. In the Wnt signaling inhibition assays, cells were pretreated with either G<sub>0</sub>6983 (5 mM) purchased from Tocris Bioscience (Bristol, U.K.), CK59 (1–50  $\mu$ M), SP600125 (20  $\mu$ M), or JSH-23 (5–10  $\mu$ M) (from Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 15 min before adding Wnt5a and GM-CSF/IL-4 mixture.

### FACS analysis

The following mAbs conjugated with FITC, PE, PE-Cy5, or allophycocyanin were used for flow cytometric analysis, as described previously (26): CD14 (M5E2) (Immunostep, Salamanca, Spain), CD1a (HI149), HLA-DR (G46-6), CD40 (5C3), CD80 (L307.4) (all from BD Biosciences, San Jose, CA), CD83 (HB15e), CD86 (IT2.2), CD197/CCR7 (TG8), CD205/DEC-205 (MG38), CD206/MMR (15-2), CD209/DC-SIGN(9E9A8), CD273/programmed cell death ligand 2 (PDL2) (24F.10C12), CD274/PDL1 (29E.2A3), CD324/E-cadherin (67A4) (BioLegend, San Diego, CA). For intracellular staining of phosphorylated STAT5, STAT6, and CaMKII,

cells were treated with CellFIX BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) and stained with PE-conjugated anti-phospho-STAT5 (Tyr<sup>694</sup>) and with PE-conjugated anti-phospho-STAT6 (Tyr<sup>641</sup>) (both from BD Biosciences) or with anti-phospho-CaMKII $\alpha$  (Thr<sup>286</sup>) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by allophycocyanin-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories). For the intracellular staining of IFN regulatory factor 1 (IRF1), IRF8, inhibitor of DNA binding 3 (ID3), suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS3), and total  $\beta$ -catenin, cells were fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm solution, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with specific rabbit polyclonal Abs for IRF1, IRF8, ID3, and SOCS3 (all from Santa Cruz Biotechnology) followed by allophycocyanin-conjugated donkey anti-rabbit IgG or with FITC-conjugated anti- $\beta$ -catenin mAb (BD Biosciences) (14). Analyses were conducted with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Complutense University, Madrid, Spain).

### Immunofluorescence analysis

For immunofluorescence analysis, monocytes were differentiated in DCs as described above but cultured in 0.8 cm<sup>2</sup> per well chamber slides (Thermo Fisher Scientific). The attached cells were fixed in situ and permeabilized using Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and stained with mouse anti-human HLA-DR (BD Biosciences) followed by Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Alexa Fluor 633-conjugated phalloidin (Invitrogen). Hoechst 33258 was used as a nuclear stain (Invitrogen). Slides were mounted with Prolong Gold (Invitrogen) and examined on an Axioplan-2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) from the Centro de Microscopía y Citometría.

### DC stimulation

At day 6 of culture, iDCs were washed to remove Wnt3a/ Wnt5a and cytokines and stimulated for 24–48 h with different TLR agonists: LPS (100 ng/ml), polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) (12.5  $\mu$ g/ml), FSL1 (100 ng/ml), ssRNA40 (1  $\mu$ g/ml), Pam3CSK4 (250 ng/ml), or flagellin (500 ng/ml) (all from Invivogen, San Diego, CA).

### Mixed lymphocyte reaction

Different numbers of TLR-DCs were used as stimulators for allogeneic naive CD4 T cells ( $1.5 \times 10^5$ ) isolated from human peripheral blood. CD45RO<sup>+</sup> CD4 T cells were labeled previously with 5  $\mu$ M CFSE (Sigma-Spain). The cocultures were performed in 96-well flat-bottom culture plates, using RPMI 1640 supplemented with 10% FCS (Invitrogen). Lymphocyte proliferation was assessed by the CFSE dilution method in CD3<sup>+</sup> cells from day 7 cocultures.

### Cytokine measurements

Culture supernatants of TLR-DCs and DC/T cell cocultures were harvested, and cytokine secretion was measured. Production of IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$ , and IL-8 and IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17a, and TGF- $\beta$  were analyzed using ELISA MAX (BioLegend) and Cytometric Bead Array (CBA) assays (BD Biosciences), respectively, according to the manufacturers' instructions.

### Internalization assays

Nonspecific pinocytosis or mannose receptor-mediated endocytosis was measured by incubating day 6 DCs at 37°C for 45 min with 1 mg/ml Lucifer yellow (Sigma-Aldrich) or 40-kDa FITC-dextran (100–500  $\mu$ g/ml), respectively. Control samples were treated similarly at 0°C. After incubation with the exogenous materials, fluorescence intensity was measured by flow cytometry.

### Real-time quantitative RT-PCR

RNA isolation and total cDNA synthesis were performed as described previously (27) for assays for ID2, ID3, PU.1, ETS1, IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF8, SOCS1, SOCS3, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, and TLR8 (all from Applied Biosystems, Foster City, CA). GAPDH (predeveloped TaqMan) was used as an endogenous control. All of the PCR reactions were set in duplicate using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Centro de Genómica, Complutense University, Madrid, Spain). The  $\Delta$ Ct method was used for normalization to GAPDH mRNA.

### Statistical analysis

Unpaired two-tailed Student *t* tests were used to compare differences. Values of  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.005$ , and  $p \leq 0.0005$  were considered to be statistically significant.

**Results**

*Wnt proteins interfere with the differentiation of iDCs from human monocytes*

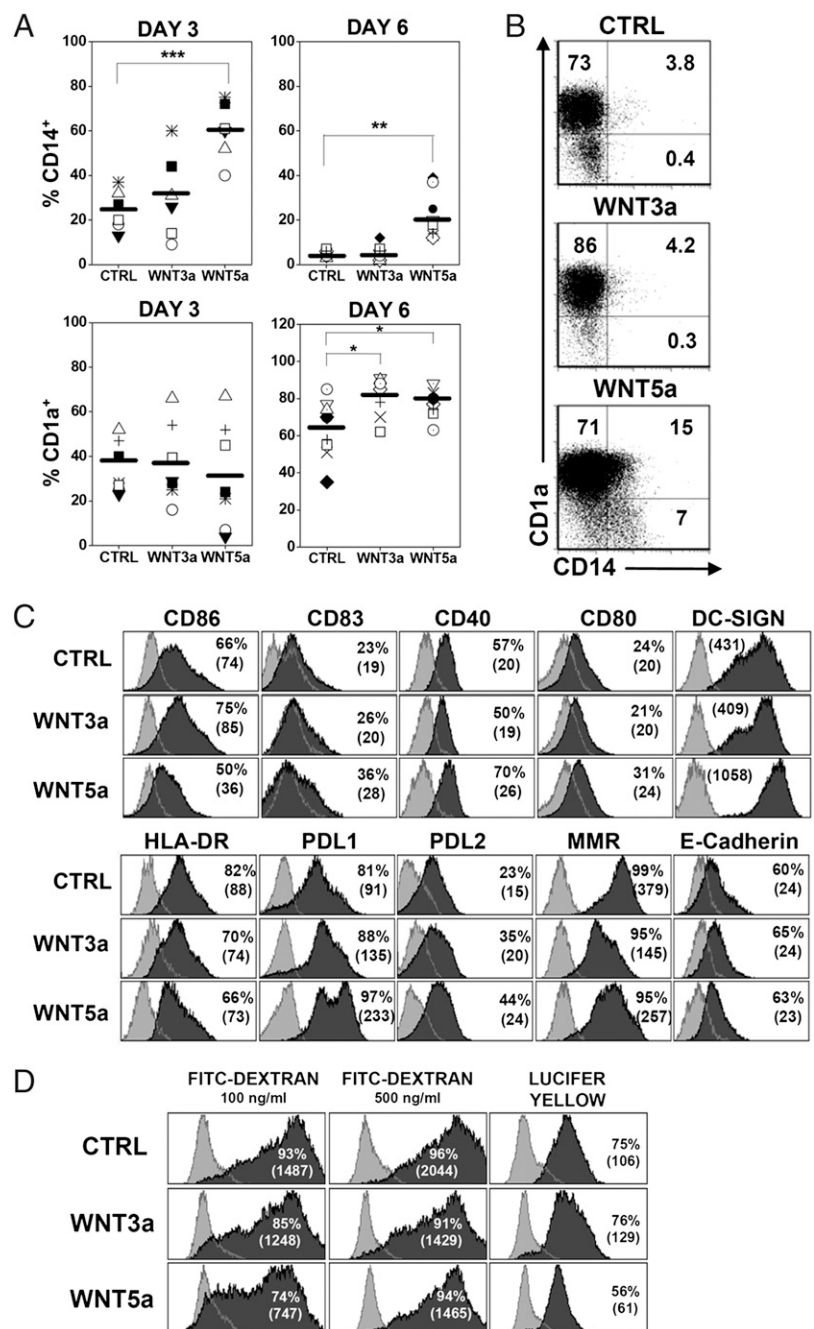
We analyzed the differentiation of peripheral blood CD14 monocytes into iDCs when cultured in serum-free medium supplemented with GM-CSF/IL-4 containing either Wnt3a or Wnt5a, typically considered canonical and noncanonical Wnt ligands, respectively.

The addition of Wnt proteins to the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture did not change total cell yield or cell survival along the culture period but triggered important modifications of the DC phenotype. These effects were more profound in cells generated under the influence of exogenous Wnt5a. The addition of Wnt5a inhibited to some extent the downregulation of CD14 expression but increased, like Wnt3a, the percentage of CD1a<sup>+</sup> cells in each individual donor (Fig. 1A, 1B). Thus, day 6 Wnt5a-treated cultures

yielded 10–40% of CD14<sup>lo</sup> cells that expressed mostly CD1a. Further phenotypic characterization of immature Wnt5a-DCs revealed a boost in DC-SIGN, PDL1, and PDL2 levels, a slight increase in CD40 levels, and a reduction in HLA-DR, CD86, and MMR expression. E-cadherin, CD80, and CD83 levels were hardly affected. Comparatively, Wnt3a treatment exerted a lower impact on DC phenotype than Wnt5a (Fig. 1C, Supplemental Table I)

Morphologically, we did not find differences in the forward side and scatter characteristics of cells detached from cultures (data not shown). However, in situ microscopic observation of HLA-DR immunofluorescence staining showed that, whereas control iDCs were mostly round cells, rich in lamellipodium extensions, Wnt-treated cells formed a network of adherent elongated cells, rich in filopodia extensions, a feature more evident in Wnt5a-treated cultures (Supplemental Fig. 1).

**FIGURE 1.** Wnt proteins alter DC differentiation from human monocytes. Human CD14<sup>+</sup> monocytes were cultured for 6 d with GM-CSF/ IL-4 in either the presence or the absence of Wnt3a (100 ng/ml) or Wnt5a (100 ng/ml). **A**, The scatter plots show the percentage of CD14<sup>+</sup> or CD1a<sup>+</sup> cells recovered after 3 or 6 d from either control or Wnt-treated cultures (*n* = 6–8). Each symbol represents the result of a single donor, and average values are indicated with horizontal bars. **B** and **C**, Phenotypic characterization of day 6 iDCs. Dot plots show CD14 versus CD1a expression (**B**), and histograms represent expression of surface Ags (black) compared with background fluorescence (light gray) (**C**). The percentage of positive cells and the total mean fluorescence intensity (MFI) (in parentheses) are shown in each histogram. Data are representative of nine independent experiments. **D**, Uptake of soluble material by iDCs. iDCs at day 6 of culture were incubated in the presence of FITC-dextran or Lucifer yellow at 37°C, and after 45 min the internalization was measured by flow cytometry (black histograms). Control samples were treated likewise at 4°C (light gray histograms). Data are representative of three independent experiments. \**p* ≤ 0.05, \*\**p* ≤ 0.005, \*\*\**p* ≤ 0.0005, by unpaired *t* test.

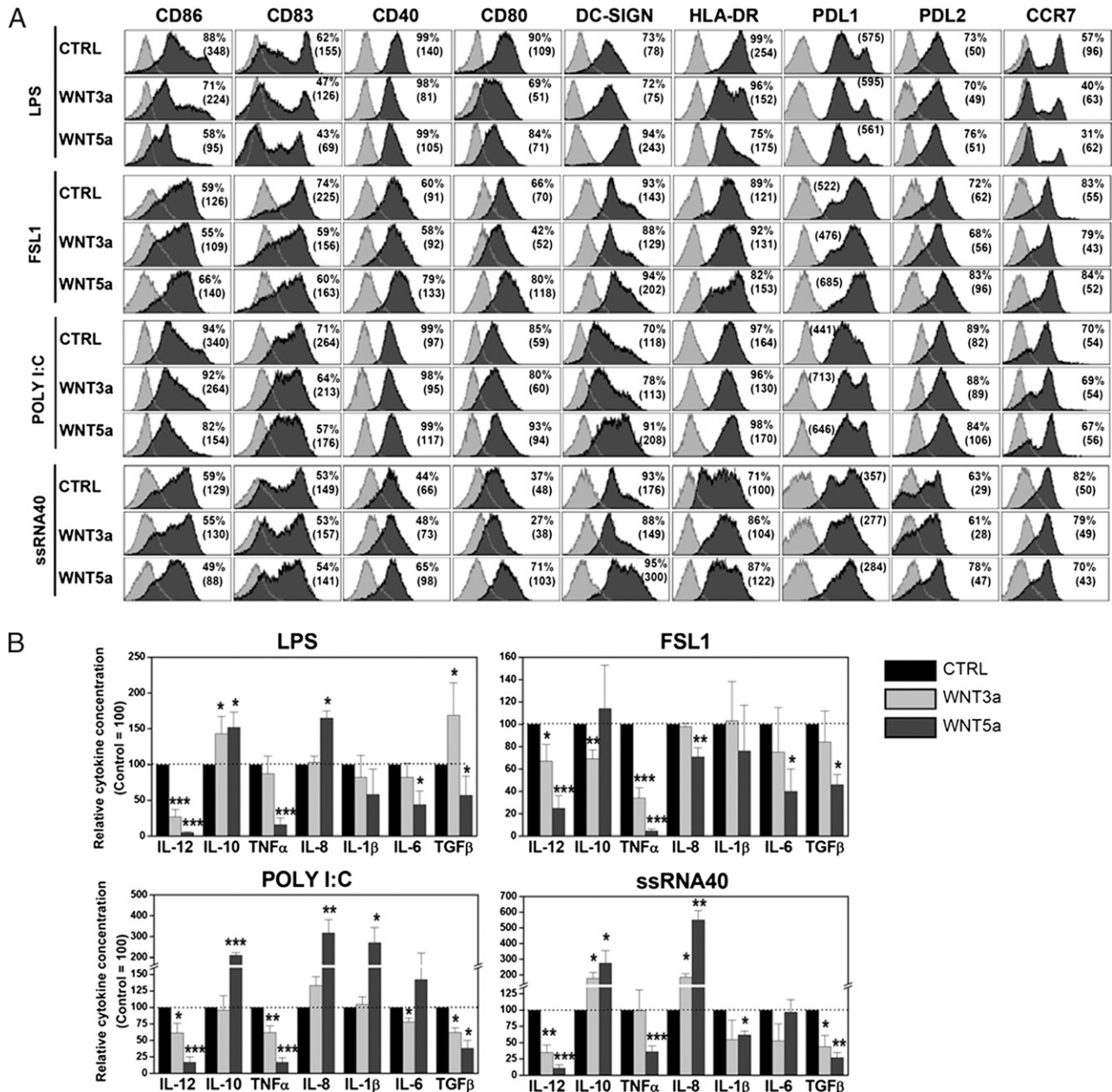


Immature DCs have the ability to internalize Ags avidly through a variety of mechanisms, including specific receptor-mediated endocytosis and nonspecific uptake by constitutive macropinocytosis. Wnt-DCs were less efficient in specific dextran uptake, which correlated with their lower expression of MMR. We also found a decrease in nonspecific fluid phase endocytosis by Wnt5a-DCs (measured as uptake of Lucifer yellow) (Fig. 1D, Supplemental Table I)

#### Wnt-DCs show an altered response to TLR ligands

Cells differentiated in the presence of Wnt proteins were analyzed for their phenotypic maturation and cytokine profile after activation

by TLR stimuli. These experiments were performed in the absence of exogenous Wnt proteins. Our results showed that the capacity of Wnt-DCs to mature after TLR ligation was altered. In general terms, Wnt5a-DCs were more affected than Wnt3a-DCs. Upon TLR4–LPS stimulation, Wnt5a-DCs did not properly upregulate CD83, HLA-DR, CD40, CD86, CD80, and CCR7 molecules. In contrast, in response to LPS, Wnt5a-DCs increased the expression of the inhibitory ligands PDL1 and PDL2 like control DCs did, which could promote inhibitory output during their interaction with T cells (Fig. 2A, Supplemental Table II). The phenotypic maturation of Wnt5a-DCs triggered by other bacterial TLR ligands, TLR2/1–Pam3CSK4, and TLR5–flagellin stimuli were



**FIGURE 2.** Response of Wnt-DCs to TLR ligands. Day 6 iDCs differentiated in the presence or absence of Wnt proteins were stimulated for 24–48 h with different TLR agonists (LPS, FSL1, poly I:C, and ssRNA40). Culture medium was replaced gently before adding the stimuli to avoid the influence of Wnt treatment. *A*, Histograms show the expression of surface molecules (black) analyzed by flow cytometry after 24 h of TLR stimulation. The percentage of positive cells, determined according to background staining (light gray), and the total MFI (in parentheses) are shown in each histogram. Data are representative of five independent experiments. *B*, Culture supernatants of TLR DCs were collected 48 h after stimulation. The supernatants were analyzed for IL-12p70, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IL-8 by ELISA and IL-1 $\beta$ , IL-6, and TGF- $\beta$  by CBA assays. Note the y-axis break and scale change at break. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of five to nine independent experiments, expressed relative to individual controls (black bars, referred to as 100%). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0005$ , by unpaired *t* test.

affected like the TLR4 response (data not shown). The response of Wnt-DCs to the synthetic lipoprotein FSL1, which signals through TLR2/6 dimers, or to viral TLR ligands, such as poly I:C/TLR3 and ssRNA40/TLR8, also was assayed, and the effects observed were less remarkable (Fig. 2A, Supplemental Table II). Nevertheless, as compared with their control counterparts, only FSL1-stimulated Wnt5a-DCs properly upregulated CD86 expression, and PDL1 or PDL2 expression was increased in Wnt5a-DCs after these stimuli.

Because cytokine production by activated DCs plays a critical role in the differentiation of primed T cells, we assessed by protein ELISA or CBA assays the capacity of Wnt-DCs to secrete diverse cytokines. Wnt-DCs produced significantly lower levels of pro-Th1 cytokines IL-12p70 and TNF- $\alpha$  than control DCs while the secretion of IL-10 regulatory cytokines was increased, the latter after all of the stimuli with the exception of FSL1 stimulation. Accordingly, the IL-10/IL-12 ratio increased, which could impair the capacity of Wnt-DCs to polarize naive T cells into Th1 clones. We also found differences in the capacity of Wnt-DCs to secrete other cytokines such as IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , and TGF- $\beta$ , but the effects were dependent on TLR stimulus and/or Wnt ligand treatment (Fig. 2B).

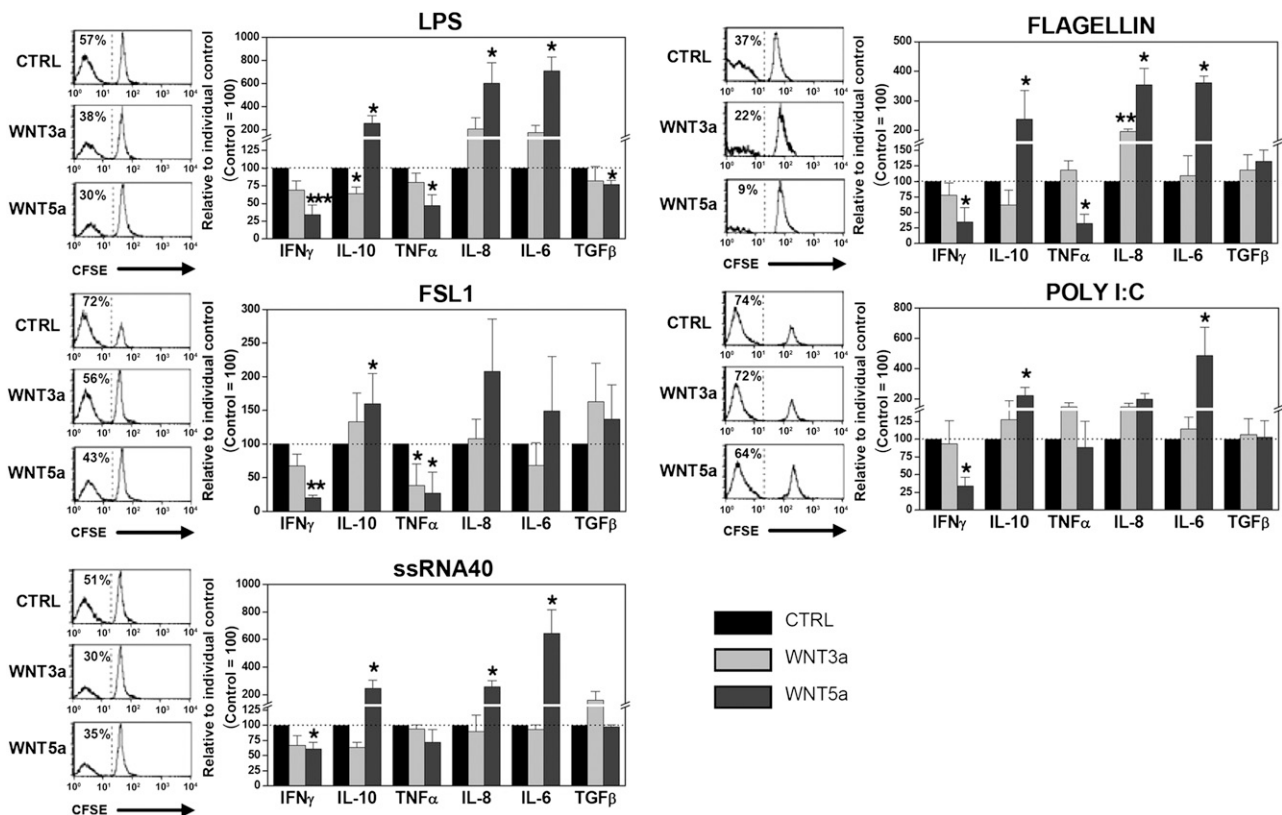
*Wnt5a-DCs stimulated through TLR are poor allostimulators that promote IL-10 secretion by naive T cells*

DCs stimulated with TLR agonists were cultured in MLR with naive CD4<sup>+</sup> T cells to analyze their allostimulatory capacity. Apart from DCs matured by poly I:C, TLR-stimulated Wnt-DCs in-

duced a lower proliferative response of T cells than their control counterparts. The ability of DCs to polarize naive T cells was determined by analyzing cytokine levels in day 7 MLR supernatants. Control DCs were able to efficiently polarize Th1 responses but failed to induce Th2 or Th17 responses, thus leading to consistent levels of IFN- $\gamma$  detected in MLR supernatants and low and undetectable levels of IL-4 and of IL-17 $\alpha$ , respectively. Naive CD4<sup>+</sup> T cells primed with TLR-stimulated Wnt5a-DCs produced lower amounts of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  but increased the secretion of IL-10, IL-8, and IL-6, the latter two only after some of the TLR stimuli. No differences were found in the secretion of IL-4 or IL-17 $\alpha$  (data not shown). With respect to Wnt3a-DCs, cytokine levels detected in these MLR supernatants were not significantly different from those found in their individual controls (Fig. 3).

*Changes in the transcription profile account for the impaired function of Wnt5a-DCs*

Downregulation of TLR expression might account for the impaired response of Wnt-DCs to TLR stimuli. Comparative real-time PCR analysis in immature control and Wnt-DCs showed that TLR3, TLR4, and TLR5 genes were transcribed in Wnt-DCs at significantly lower levels than those in their individual controls, which agrees with their inadequate response upon stimulation with poly I:C, LPS, and flagellin, respectively. However, although the response of Wnt5a-DCs to Pam3CSK4, FSL1, or ssRNA40 also was affected, we did not find significant changes in TLR2, TLR6, or TLR8 transcript levels, and we observed an increase of TLR1



**FIGURE 3.** TLR-stimulated Wnt5a-DCs show lower allostimulatory capacity and promote IL-10 secretion by naive T cells. DCs stimulated with TLR agonists were cultured in MLR with CFSE-labeled allogeneic naive CD4<sup>+</sup> T cells at a 1:10 DC/T cell ratio. After 7 d, lymphocytes were harvested, and the percentage of proliferating cells was calculated by the CFSE dilution method (gated on the CD3<sup>+</sup> cell population). Histograms show the percentage of cells with  $\geq 1$  cycle of division (using T cells cultured in the absence of stimulation as controls). Data are representative of at least three independent experiments. Supernatants of DC/T cell cocultures were harvested at day 7, and the amounts of IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, and TGF- $\beta$  were tested. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of six to nine independent experiments, expressed relative to individual controls (black bars; referred to as 100%). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0005$ , by unpaired  $t$  test.

transcription in Wnt5a-DCs (Fig. 4A). We therefore investigated whether other mechanisms irrespective of TLR expression also could determine the functional characteristics of Wnt-DCs.

An analysis of mRNA levels for several transcriptional regulators revealed that immature Wnt5a-DCs expressed lower levels of ID2 and IRF8, an essential regulator of IL-12 expression, and showed higher amounts of IRF1 and IRF2 transcripts. IRF1 and IRF8 are critical for IL-12 transcription (28), and consequently their transcription was induced in control DCs after LPS stimulus (6- to 14-fold increase). Wnt5a-DCs failed to properly upregulate the expression of both genes after LPS stimulation (Fig. 4C), which led to lower IRF8 and IRF1 protein levels (Fig. 4D). Interestingly, Wnt-DCs showed higher levels of ID3 and SOCS3 expression (Fig. 4B, 4E).

*Wnt5a diminishes the response of monocytes to the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture and alters the DC differentiation genetic program*

Because the outcome of in vitro monocyte differentiation into DCs ultimately depends on efficient GM-CSF and IL-4 signaling, we examined the phosphorylation of STAT5 and STAT6 in monocytes treated with Wnt5a or Wnt3a. Treatment of monocytes with Wnt proteins resulted in significant but partial inhibition of both STAT5 and STAT6 phosphorylation. These inhibitory effects became evident within the time frame between 2 and 20 h of cell culture, which suggests that they are a secondary effect of Wnt signaling (Fig. 5A). We found that Wnt treatment induced SOCS3, but not SOCS1, expression during the first hours of culture (Fig. 5B). SOCS3 showed the highest transcription in Wnt5a-treated cultures at 3 h (Fig. 5B) but as mentioned above remained high in day 6 iDCs (Fig. 4B).

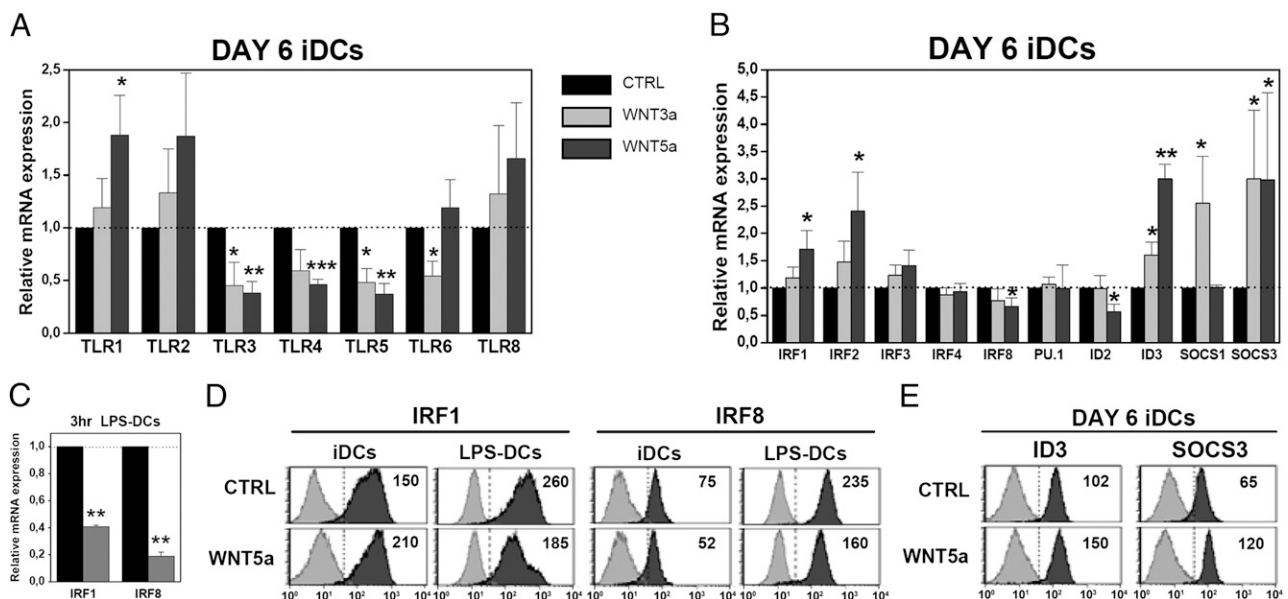
During the first hours of monocyte culture, GM-CSF/IL-4 signaling triggers a genetic program that leads to DC development, inducing drastic changes in the expression of several regulatory

proteins and transcription factors critical for DC differentiation (Fig. 5C). In agreement with a modulatory, but not blocking, effect of Wnt5a in DC differentiation, we found normal regulation of most of these genes during the first hours of culture. Nevertheless, Wnt5a treatment blocked the important reduction of ID2 transcription observed in control monocytes during the first 3 h of culture and partially inhibited the upregulation of IRF3 and PU.1 gene expression that occurred in the following 17 h. During this period, Wnt5a treatment also induced a decrease in IRF8 transcription, which, as described above, remained lower than that in controls in day 6 iDCs (Fig. 4B).

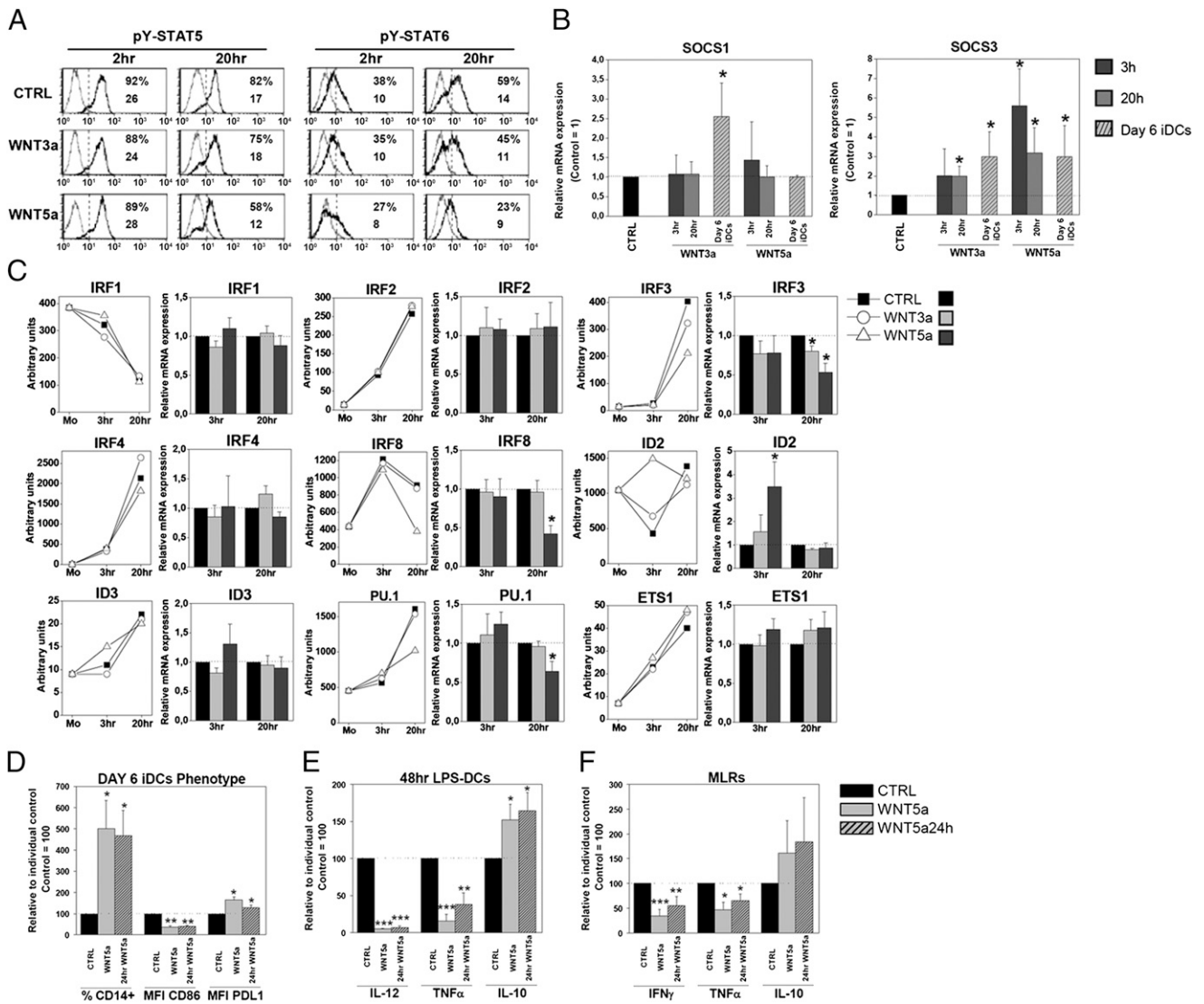
The foregoing results are consistent with an early effect of Wnt5a signaling on DC differentiation. Consequently, we observed that the addition of Wnt5a only during the first 24 h of culture was sufficient to exert most of its effects (Fig. 5D-F). Monocytes that begin to differentiate into DCs in an environment rich in Wnt5a therefore would differentiate into functionally impaired DCs independently of later Wnt5a signaling.

*Wnt signaling induces the secretion of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  by monocytes*

Monocytes could respond to Wnt5a by secreting cytokines such as IL-6 or IL-10 that can interfere with DC differentiation. Supernatants from Wnt5a-treated cultures contained extremely high amounts of IL-6 and IL-10 cytokines compared with those of their control counterparts (Fig. 6A). Again, the effects of Wnt5a were significantly higher than those of Wnt3a. The induction of IL-6 secretion by Wnt5a was evident after 3 h of culture and peaked at 24 h (Fig. 6B). IL-10 secretion began later than that of IL-6 and was evident only after the overnight culture period. After this initial boost of IL-6 and IL-10 secretion in Wnt-treated cultures, cytokine levels remained higher until day 6 (data not shown). In the absence of the GM-CSF/IL-4 mixture, monocytes treated with Wnt5a doubled IL-6 and IL-10 secretion (data not shown). This



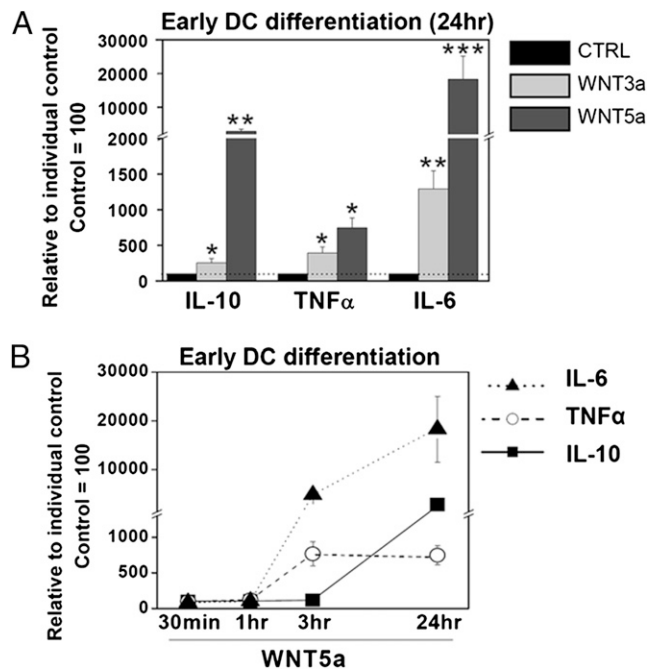
**FIGURE 4.** Changes in the transcription profile of Wnt5a-DCs correlate with their unconventional phenotype. *A* and *B*, Real-time PCR quantification of mRNA levels in day 6 iDCs differentiated from monocytes in the presence or absence of Wnt proteins. mRNA expression of different TLRs (*A*) and transcriptional factors and regulatory proteins (*B*) in Wnt-DCs are expressed relative to individual control values (black bars; referred to as 1). *C*, Control and Wnt5a-DCs were stimulated with LPS for 3 h, and IRF1 and IRF8 mRNA expression was analyzed. Variations between samples were corrected by normalizing against the expression of GAPDH, which was used as an endogenous control. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of three to five independent experiments. *D* and *E*, Intracellular IRF1, IRF8 (*D*), ID3, and SOCS3 (*E*) protein levels were analyzed by flow cytometry in control and Wnt5a day 6 iDCs or after 20 h of LPS stimulation. The total MFI (in parentheses) is shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0005$ , by unpaired *t* test.



**FIGURE 5.** Wnt5a interferes with GM-CSF/IL-4 cytokine signaling and modified the early DC differentiation program. Human CD14<sup>+</sup> monocytes were cultured with GM-CSF/IL-4 in either the presence or the absence of Wnt3a or Wnt5a. **A**, After 2 or 20 h of culture, intracellular STAT5 and STAT6 tyrosine phosphorylation levels were analyzed by flow cytometry. The percentage of positive cells, determined according to background staining (gray histograms), and the total MFI are shown in each histogram. Data are representative of four independent experiments. **B**, SOCS1 and SOCS3 expression was analyzed by quantitative RT-PCR analysis during Wnt-DC differentiation (3 and 20 h of culture and day 6 iDCs). Data shown are relative to individual control values (black; set as 1). **C**, Monocytes were cultured as indicated for 0 (monocyte, Mo), 3, or 20 h, and the expression of several transcription factors and regulatory proteins were analyzed by quantitative RT-PCR. Line graphs represent the kinetics of mRNA expression in control (black squares), Wnt3a (open circles), or Wnt5a (open triangles) cultures; data are representative of three independent experiments. Bar graphs show transcription levels relative to individual control values (black bar; referred to as 1). Data represent the mean ( $\pm$ SD) of four independent experiments. Variations between samples were corrected by normalizing against the expression of GAPDH, which was used as an endogenous control. **D–F**. The first 24 h of culture are sufficient for inducing Wnt5a effects in DC differentiation. Human CD14<sup>+</sup> monocytes were cultured in the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture as described above. Wnt5a was added to the DC differentiation culture (Wnt5a-DCs) or during just the first 24 h (24 h-Wnt5a-DCs). To remove Wnt5a, culture medium was replaced with 24 h GM-CSF/IL-4 monocyte-conditioned medium. Both control and Wnt5a cultures underwent an equivalent process. **D**, Flow cytometry analysis of day 6 iDCs. The percentage of CD14<sup>+</sup> cells and the mean fluorescence values of CD86 and PDL1 are shown for Wnt5a and 24 h-Wnt5a-DCs relative to those of control iDCs cultures. **E**, Control, Wnt5a, and 24 h-Wnt5a-DCs were stimulated with LPS for 48 h. Production of IL-12p70, TNF- $\alpha$ , and IL-10 in culture supernatants was quantified by ELISA. **F**, Cytokine production of primed T cells. DCs stimulated with LPS were cultured in MLR with naive CD4<sup>+</sup> T cells at a 1:10 DC/T cell ratio. Supernatants of DC/T cell cocultures were harvested at day 7, and the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 were tested by ELISA. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of four to five independent experiments, expressed relative to individual controls (black bars; referred to as 100%). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0005$ , by unpaired *t* test.

suggests that signals inducing DC differentiation could inhibit monocyte response to Wnt5a. Remarkably, iDCs and cord blood-derived CD14<sup>+</sup> cells did not secrete IL-6 or IL-10 in response to the same dose of Wnt5a, thus suggesting that this response was specific to monocytes (J. Valencia and R. Sacedón, unpublished observations).

In contrast with the effects observed after Wnt5a treatment, the addition of high doses of IL-6 (100 ng/ml) to GM-CSF/IL-4 monocyte cultures have been proven to skew monocyte differentiation to macrophages that maintain CD14 expression but lack CD1a (29). However, simultaneous addition of TNF- $\alpha$  may overcome IL-6-driven macrophage differentiation by inhibiting



**FIGURE 6.** Wnt signaling induces IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  secretion during early DC differentiation. Human CD14<sup>+</sup> monocytes were cultured with GM-CSF/IL-4 in the presence or absence of Wnt3a or Wnt5a. *A*, After 24 h of culture, supernatants were harvested and analyzed for IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ . Absolute cytokine levels of control cultures: IL-6, 77.4  $\pm$  22 pg/ml; IL-10, 9  $\pm$  4 pg/ml; TNF- $\alpha$ , 117  $\pm$  41 pg/ml. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of four independent experiments, expressed relative to individual control (black bars; referred to as 100%). *B*, Kinetic cytokine production. Supernatants of Wnt5a-DC cultures were harvested at 30 min, 1, 3, and 24 h, and the levels of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  were tested. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of three independent experiments, expressed relative to individual control (referred to as 100%). Note the y-axis break and scale change at break. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0005$ , by unpaired *t* test.

M-CSF signaling in monocytes (30). We therefore analyze TNF- $\alpha$  in DC differentiating cultures and observe that Wnt proteins also promoted TNF- $\alpha$  secretion, which may redirect DC differentiation (Fig. 6A, 6B).

#### Noncanonical signaling mediates Wnt5a response in monocytes

We next analyzed the signaling mechanisms by which Wnt5a altered DC differentiation. Central to the Wnt canonical pathway is the stabilization of  $\beta$ -catenin protein through the inhibition of GSK3. Using flow cytometry, we observed that the levels of  $\beta$ -catenin increased in human monocytes after 3 h of DC differentiation culture but decreased during the following 20 h. The addition of Wnt5a to monocyte cultures interfered with  $\beta$ -catenin accumulation and reduced its levels with respect to their individual controls (Fig. 7A), thus suggesting that Wnt5a effects could be independent of  $\beta$ -catenin transcriptional activities. In support of this possibility, stabilization of  $\beta$ -catenin by LiCl treatment of GM-CSF/IL-4 monocyte cultures did not mimic Wnt5a effects (25) (Supplemental Fig. 2).

Alternatively, through a noncanonical pathway, Wnt5a can stimulate intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization, which acts as a secondary messenger and can trigger CaMKII activation (31). Supporting this option, we demonstrated by flow cytometry that, although control cultures showed a basal level of CaMKII activation, Wnt5a induced a higher percentage and intensity mean values for phos-

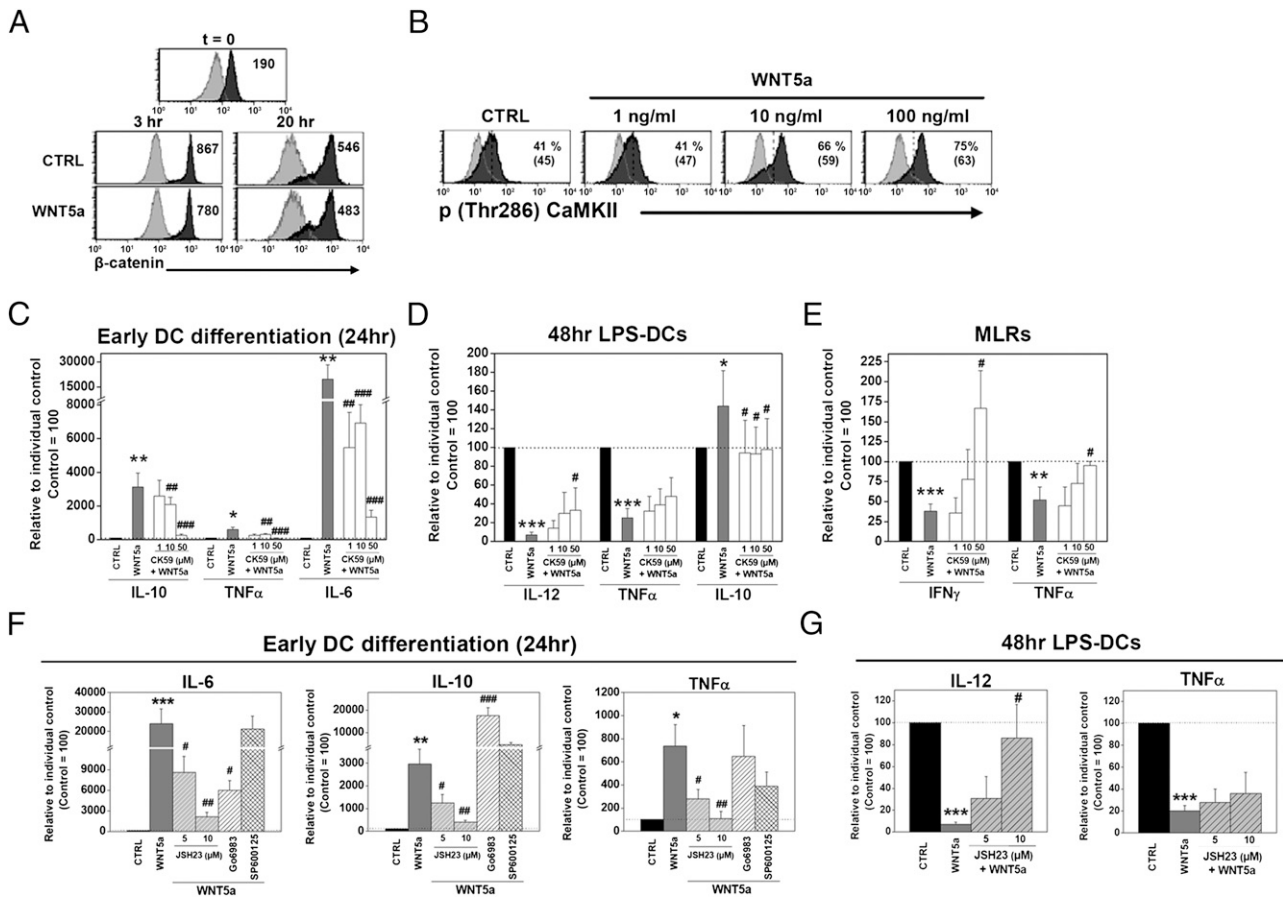
pho-CaMKII $\alpha$  (Thr<sup>286</sup>) staining (Fig. 7B). We next checked whether the specific inhibition of CaMKII by CK59 could rescue DC differentiation and function after Wnt5a treatment. To this purpose, we restricted the treatments (Wnt5a alone or with the specific inhibitor) to the first 24 h of differentiation cultures, thus avoiding the possible toxic effects of a longer treatment with the CaMKII inhibitor. We followed this procedure with all of the inhibitors used. We found that, in a dose-dependent manner, CK59 almost blocked monocyte cytokine secretion induced by Wnt5a during the first hours of the GM-CSF/IL-4 cultures (Fig. 7C) and restored several of the phenotypic (data not shown) and functional (Fig. 7E) alterations found in Wnt5a-DCs. However, CaMKII inhibition did not recover IL-12/TNF- $\alpha$  production by Wnt5a-DCs after LPS stimulation (Fig. 7D). This observation suggests that Wnt5a signaling also may activate alternative pathways.

As a consequence of intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization, concomitantly with CaMKII activation, Wnt5a signaling can switch on PKC and, independently of Ca<sup>2+</sup>, can signal via JNK (15, 16). A JNK-specific inhibitor (SP600125) did not reduce the amount of IL-6 secreted by monocytes in response to Wnt5a but increased that of IL-10 (Fig. 7F). The inhibition of PKC (Go6983) was able to reduce IL-6 in supernatants from monocytes treated with Wnt5a but drastically increased IL-10 secretion (Fig. 7F). Accordingly, these inhibitors did not recover IL-12 and TNF- $\alpha$  secretion by Wnt5a-DCs (data not shown). Wnt5a also could activate NF- $\kappa$ B activity (23, 32) through an incompletely understood mechanism. Inhibition of NF- $\kappa$ B significantly reduced the secretion of cytokines by monocytes in response to Wnt5a and restored IL-12 secretion by Wnt5a-DCs, thus demonstrating a role for NF- $\kappa$ B in the effect of Wnt5a (Fig. 7F, 7G).

#### Discussion

In this report, we demonstrate that the increase in Wnt5a signaling during the differentiation of DCs compromises their functional capabilities. Wnt5a does not block the generation of DCs from monocytes but induces irreversible changes in their genetic differentiation program, thus leading to phenotypically altered DCs that present a lower capacity to uptake Ags and show an altered response to TLR ligands. Wnt5a-DCs stimulated via TLR produce scant amounts of IL-12p70 and TNF- $\alpha$  but increased amounts of IL-10. They have a reduced allostimulatory capacity and lead to less IFN- $\gamma$  production but higher IL-10 secretion in MLR assays. The transcriptional profile of Wnt5a-DCs reveals changes that could account for their functional failures, presumably related in part with the high autocrine IL-6 and IL-10 signaling during the process of DC differentiation. The effect of Wnt5a is not dependent on  $\beta$ -catenin accumulation but is driven by Ca<sup>2+</sup>-dependent noncanonical signaling, and inhibition of CaMKII and NF- $\kappa$ B activation restores normal DC differentiation despite Wnt5a treatment.

The effects of canonical Wnt3a on DC differentiation are not opposite to those exerted by Wnt5a, a prototypical Wnt for noncanonical signaling. On the contrary, there are some concordances between both treatments, although Wnt3a is not able to induce most of the changes found after Wnt5a treatment or its effects are less strong. This suggests a low level of signaling potency for Wnt3a on human monocytes. Wnt signaling output is dependent on both Wnt ligand and receptor context, and the same receptor complex, through dishevelled activation, can activate two (or more) routes in parallel (15, 16). Normally, a cell population expresses a mixture of Wnt receptors, and it is difficult to forecast ultimate Wnt signaling output. Human monocytes express LRP6 (33) and several Fzd (Fzd1, Fzd4, Fzd5, and Fzd7) (34) receptors. Monocyte culture induces an initial  $\beta$ -catenin stabilization, probably induced



**FIGURE 7.** Wnt5a signals in monocytes through a noncanonical pathway. Human CD14<sup>+</sup> monocytes were cultured in the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture as described above. *A*, Intracellular levels of  $\beta$ -catenin in monocytes and after 3 or 20 h of culture with or without Wnt5a. Total MFI is shown in each histogram. Data are representative of four independent experiments. *B*, Intracellular phospho-CaMKII $\alpha$  (Thr<sup>286</sup>) levels were analyzed by flow cytometry after 1 h under control conditions or in the presence of increasing doses of Wnt5a (1, 10, or 100 ng/ml). The percentage of positive cells, determined according to background staining (light gray), and the total MFI (in parentheses) are shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments. *C–G*, Human CD14<sup>+</sup> monocytes were differentiated into DCs in the presence of Wnt5a plus different doses of specific inhibitors for CaMKII (CK59; 1–50  $\mu$ M), NF- $\kappa$ B (JSH-23; 5–10  $\mu$ M), PKC (Go6983; 5  $\mu$ M), or JNK (SP600125; 20  $\mu$ M). After 24 h of GM-CSF/IL-4 culture, treatments were removed, and culture medium was replaced by 24 h GM-CSF/IL-4 monocyte-conditioned medium. Both control and treated cultures underwent an equivalent process. Supernatants from 24 h GM-CSF/IL-4 cultured monocytes (*C*, *F*), 48 h LPS-stimulated DCs (*D*, *G*), and MLR cultures established with LPS DCs (as described above) (*E*) were harvested, and the amounts of different cytokines were analyzed. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of three to four independent experiments, expressed relative to individual control (black bars; referred to as 100%). \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.0005$ , significance relative to control nontreated cultures by unpaired *t* test. # $p \leq 0.05$ , ## $p \leq 0.005$ , ### $p \leq 0.0005$ , significance relative to Wnt5a-DCs by unpaired *t* test.

by the adhesion process (35), although later, presumably as a response to DC differentiation signals, the levels of  $\beta$ -catenin decrease. In fact, GSK3 activity is crucial for the differentiation of monocytes into DCs and prevents their deviation to macrophage lineage (25) (results reported in this article), and the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture should induce its activation. In our cultures, Wnt5a does not increase  $\beta$ -catenin over control values; rather, on the contrary, we observed that it causes a slight decrease. Indeed, Wnt5a has been demonstrated to antagonize the canonical Wnt pathway and promote  $\beta$ -catenin degradation independently of GSK3 activity in fibroblasts, hematopoietic stem cells, and cancer cells (36, 37). Alternatively to the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, our current results indicate that monocytes respond to Wnt5a through a noncanonical Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway that increases CaMKII activity and NF- $\kappa$ B, a signaling route that shares common features with TLR-mediated activation (38, 39), which has been demonstrated to block DC differentiation (40, 41). Wnt5a also activates this noncanonical pathway in macrophages and endothelium and triggers a proinflammatory response (14, 23). Similarly, our results

show that monocytes are stimulated by Wnt5a to secrete proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- $\alpha$  but also IL-10, which, in part, could mediate Wnt5a effects on DC differentiation.

DCs play a dual role in governing T cell responses. Depending on their functional capabilities, DCs can stimulate or suppress immune reactions. Their ability to acquire immunostimulatory features in response to exogenous stimuli, such as TLR ligation, is crucial to mediate the interplay between innate and adaptive immune responses against pathogens, because immature or partially mature DCs may exert a tolerogenic or immunosuppressive effect. Accordingly, tolerogenic DCs generated *in vitro* do not mature properly in response to TLR stimuli and are characterized by lower IL-12 secretion and increased IL-10 production like Wnt5a-DCs (42, 43). Hyporesponsiveness of Wnt5a-DCs to stimuli via TLR could underlie part of their functional defects. However, although Wnt5a-DCs show lower expression of TLR3, TLR4, and TLR5 than control DCs, we found higher or normal levels of TLR1, TLR2, TLR6, and TLR8 transcripts. The higher expression of SOCS3 observed in Wnt5a-DCs also can interfere with their stim-

ulation, because it abrogates the cytokine Jak-Stat signal transduction pathway (44). Analogous with our results, SOCS3 overexpressing DCs secrete low amounts of IL-12 but high levels of IL-10 and show a tolerogenic phenotype (45). Expression of SOCS3 has been proven to be induced by different cytokines, including IL-6 and IL-10 (44), which were increased during DC differentiation in the presence of Wnt5a. High IL-10 signaling during DC differentiation also could be one of the causes for increased ID3 expression in Wnt5a-DCs, which in turn would account for the higher capacity of Wnt5a-DCs to secrete IL-10. In support of this hypothesis, IL-10 signaling increases ID3 expression, and ID3 overexpression enhanced IL-10 production in CD14<sup>+</sup> monocytes, thus establishing a positive feedback in the regulation of these genes (46). In agreement, high ID3 expression is characteristic of TGF- $\beta$ /IL-4 activated M2 macrophages that express increased levels of IL-10 (47). Another feature of Wnt5a-DCs previously reported in tolerogenic DCs is their reduced expression of ID2 (42), although its functional significance remains elusive. In any case, the most remarkable characteristic of Wnt5a-DCs is their failure to secrete IL-12 in response to all of the TLR stimuli assayed, even those that lead to normal CD83 expression. Higher SOCS3 expression or the IL-10/ID3 signaling loop may interfere with IL-12 expression. Indeed, Wnt5a-DCs failed to properly increase IRF1 and IRF8 transcription after stimulation, two positive and essential factors for priming IL-12 secretion (28).

Recent reports reveal that the Wnt signaling pathway components have a role during the differentiation of DCs and shape their functional features. However, their involvement seems to be complex and dependent on developmental stage and/or DC lineage. In support of a positive effect for canonical Wnt signaling on DC differentiation and function, Zhou et al. (5) show that the addition of Wnt3a or the inhibition of GSK3 increase the proportion of DCs recovered from hematopoietic progenitor cell cultures and promote their allostimulatory capacity, while  $\beta$ -catenin deletion has the opposite effect. Nevertheless, GSK3 inhibition blocks the differentiation of monocytes into DCs, (25) and transient  $\beta$ -catenin stabilization reduces the capacity of human thymic progenitors to yield DCs (27). However, GSK3 activity is necessary to avoid spontaneous but abnormal maturation of DCs (4, 25), and specific knockout of the  $\beta$ -catenin gene after CD11c expression in DCs disrupts intestinal immunotolerance, enhancing the onset of inflammatory bowel diseases (6).

In vivo Wnt5a levels increase under numerous proinflammatory situations. Monocytes and macrophages upregulate Wnt5a secretion in response to different bacterial stimuli, thus increasing Wnt5a levels in the sera from patients with sepsis (14). Wnt5a also is detected in human inflammatory diseases such as granulomatous lesions from patients infected with *Mycobacterium tuberculosis* (22), atherosclerotic plaques, and rheumatoid arthritis but not in normal tissue (23). Under these conditions, monocytes could respond to Wnt5a, and this could interfere with their differentiation into DCs, resulting in an in vivo effect similar to that shown in this article. Accordingly, Wnt5a might contribute to the attenuation of inflammatory responses or to chronic bacterial infection that negatively affect the function of DCs that differentiate after the onset of the inflammatory process. Likewise, Wnt5a also could be a factor that contributes to the observed dysfunction of DCs that develops during polymicrobial sepsis that impairs the resolution of secondary infections (48). Nevertheless, the local concentrations of soluble inhibitors for Wnt5a or additional and unknown signals produced during the inflammatory process could override Wnt5a-negative effects, allowing normal DC development. Indeed, monocyte-derived DCs develop under inflammatory conditions (49, 50), and our results indicate that the GM-

CSF/IL-4 cytokine mixture attenuates the response of monocytes to Wnt5a.

In conclusion, Wnt5a is produced under inflammatory conditions and exerts a proinflammatory role acting on macrophages or endothelium (14, 22, 23). However, our results suggest that this Wnt protein also could activate monocytes and that this would interfere with the DC differentiation program, thus leading to unconventional DCs with tolerogenic features. Further research is necessary to determine in vivo factors that drive monocyte-derived DC differentiation under high concentrations of Wnt5a that are typical of the inflammatory state or bacterial infection. The identification of such a signaling milieu could upgrade the design of more effective immunotherapeutic strategies for the treatment of infection and sepsis.

## Acknowledgments

We thank the Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid for providing buffy coat samples.

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Coquerelle, C., and M. Moser. 2010. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol. Rev.* 234: 317–334.
- Ueno, H., N. Schmitt, E. Klechevsky, A. Pedroza-Gonzalez, T. Matsui, G. Zurawski, S. Oh, J. Fay, V. Pascual, J. Banchereau, and K. Palucka. 2010. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol. Rev.* 234: 199–212.
- Naik, S. H. 2008. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol. Cell Biol.* 86: 439–452.
- Jiang, A., O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J. A. Whitney, J. Connolly, J. Banchereau, and I. Mellman. 2007. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27: 610–624.
- Zhou, J., P. Cheng, J. I. Youn, M. J. Cotter, and D. I. Gabrilovich. 2009. Notch and wingless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation. *Immunity* 30: 845–859.
- Manicassamy, S., B. Reizis, R. Ravindran, H. Nakaya, R. M. Salazar-Gonzalez, Y. C. Wang, and B. Pulendran. 2010. Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science* 329: 849–853.
- van Amerongen, R., and R. Nusse. 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136: 3205–3214.
- Hoeppner, L. H., F. J. Secreto, and J. J. Westendorf. 2009. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 13: 485–496.
- Ouchi, N., A. Higuchi, K. Ohashi, Y. Oshima, N. Gokce, R. Shibata, Y. Akasaki, A. Shimono, and K. Walsh. 2010. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329: 454–457.
- Staal, F. J., and T. C. Luis. 2010. Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J. Cell. Biochem.* 109: 844–849.
- Wend, P., J. D. Holland, U. Ziebold, and W. Birchmeier. 2010. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21: 855–863.
- Brack, A. S., M. J. Conboy, S. Roy, M. Lee, C. J. Kuo, C. Keller, and T. A. Rando. 2007. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317: 807–810.
- Liu, H., M. M. Fergusson, R. M. Castilho, J. Liu, L. Cao, J. Chen, D. Malide, I. I. Rovira, D. Schimel, C. J. Kuo, et al. 2007. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 317: 803–806.
- Pereira, C., D. J. Schaer, E. B. Bachli, M. O. Kurrer, and G. Schoedon. 2008. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 504–510.
- Rao, T. P., and M. Kühl. 2010. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ. Res.* 106: 1798–1806.
- Gao, C., and Y. G. Chen. 2010. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell. Signal.* 22: 717–727.
- Wu, D., and W. Pan. 2010. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* 35: 161–168.
- Beurel, E., S. M. Michalek, and R. S. Jope. 2010. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol.* 31: 24–31.
- Beurel, E., W. I. Yeh, S. M. Michalek, L. E. Harrington, and R. S. Jope. 2011. Glycogen synthase kinase-3 is an early determinant in the differentiation of pathogenic Th17 cells. *J. Immunol.* 186: 1391–1398.
- Wu, B., S. P. Crompton, and C. C. Hughes. 2007. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26: 227–239.
- Neumann, J., K. Schaale, K. Farhat, T. Endermann, A. J. Ulmer, S. Ehlers, and N. Reiling. 2010. Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its

- ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *FASEB J.* 24: 4599–4612.
22. Blumenthal, A., S. Ehlers, J. Lauber, J. Buer, C. Lange, T. Goldmann, H. Heine, E. Brandt, and N. Reiling. 2006. The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108: 965–973.
  23. Kim, J., J. Kim, D. W. Kim, Y. Ha, M. H. Ihm, H. Kim, K. Song, and I. Lee. 2010. Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. *J. Immunol.* 185: 1274–1282.
  24. Sen, M. 2005. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44: 708–713.
  25. Rodionova, E., M. Conzelmann, E. Maraskovsky, M. Hess, M. Kirsch, T. Giese, A. D. Ho, M. Zöller, P. Dreger, and T. Luft. 2007. GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109: 1584–1592.
  26. Martínez, V. G., C. Hernández-López, J. Valencia, L. Hidalgo, A. Entrena, A. G. Zapata, A. Vicente, R. Sacedón, and A. Varas. 2011. The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunol. Cell Biol.* 89: 610–618.
  27. Valencia, J., C. Hernández-López, V. G. Martínez, L. Hidalgo, A. G. Zapata, A. Vicente, A. Varas, and R. Sacedón. 2010. Transient beta-catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34+CD1a- progenitors. *J. Leukoc. Biol.* 87: 405–414.
  28. Liu, J., S. Cao, S. Kim, E. Y. Chung, Y. Homma, X. Guan, V. Jimenez, and X. Ma. 2005. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr. Immunol. Rev.* 1: 119–137.
  29. Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* 1: 510–514.
  30. Chomarat, P., C. Dantin, L. Bennett, J. Banchereau, and A. K. Palucka. 2003. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J. Immunol.* 171: 2262–2269.
  31. Kühl, M., L. C. Sheldahl, M. Park, J. R. Miller, and R. T. Moon. 2000. The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 16: 279–283.
  32. Bradley, E. W., and M. H. Drissi. 2010. WNT5A regulates chondrocyte differentiation through differential use of the CaN/NFAT and IKK/NF-kappaB pathways. *Mol. Endocrinol.* 24: 1581–1593.
  33. Spencer, G. J., J. C. Utting, S. L. Etheridge, T. R. Arnett, and P. G. Genever. 2006. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J. Cell Sci.* 119: 1283–1296.
  34. Tickenbrock, L., J. Schwäble, A. Strey, B. Sargin, S. Hehn, M. Baas, C. Choudhary, V. Gerke, W. E. Berdel, C. Müller-Tidow, and H. Serve. 2006. Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 79: 1306–1313.
  35. Thiele, A., M. Wasner, C. Müller, K. Engeland, and S. Hauschildt. 2001. Regulation and possible function of beta-catenin in human monocytes. *J. Immunol.* 167: 6786–6793.
  36. Topol, L., X. Jiang, H. Choi, L. Garrett-Beal, P. J. Carolan, and Y. Yang. 2003. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J. Cell Biol.* 162: 899–908.
  37. Nemeth, M. J., L. Topol, S. M. Anderson, Y. Yang, and D. M. Bodine. 2007. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15436–15441.
  38. Liu, X., M. Yao, N. Li, C. Wang, Y. Zheng, and X. Cao. 2008. CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages. *Blood* 112: 4961–4970.
  39. Kawai, T., and S. Akira. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13: 460–469.
  40. Bartz, H., N. M. Avalos, A. Baetz, K. Heeg, and A. H. Dalpke. 2006. Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor-mediated block of dendritic cell differentiation. *Blood* 108: 4102–4108.
  41. Wölflle, S. J., J. Strebovsky, H. Bartz, A. Sähr, C. Arnold, C. Kaiser, A. H. Dalpke, and K. Heeg. 2011. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur. J. Immunol.* 41: 413–424.
  42. Torres-Aguilar, H., S. R. Aguilar-Ruiz, G. González-Pérez, R. Munguía, S. Bajaña, M. A. Meraz-Ríos, and C. Sánchez-Torres. 2010. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 184: 1765–1775.
  43. Chamorro, S., J. J. García-Vallejo, W. W. Unger, R. J. Fernandes, S. C. Bruijns, S. Laban, B. O. Roep, B. A. 't Hart, and Y. van Kooyk. 2009. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol.* 183: 2984–2994.
  44. Dimitriou, I. D., L. Clemenza, A. J. Scotter, G. Chen, F. M. Guerra, and R. Rottapel. 2008. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol. Rev.* 224: 265–283.
  45. Li, Y., N. Chu, A. Rostami, and G. X. Zhang. 2006. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 177: 1679–1688.
  46. Kuo, P. L., J. Y. Hung, S. K. Huang, S. H. Chou, D. E. Cheng, Y. J. Jong, C. H. Hung, C. J. Yang, Y. M. Tsai, Y. L. Hsu, and M. S. Huang. 2011. Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway. *J. Immunol.* 186: 1521–1530.
  47. Gratchev, A., J. Kzhyshkowska, S. Kannoakadan, M. Ochsenreiter, A. Popova, X. Yu, S. Mamidi, E. Stonehouse-Usselman, I. Muller-Molinet, L. Gooi, and S. Goerd. 2008. Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-beta receptor II. *J. Immunol.* 180: 6553–6565.
  48. Pastille, E., S. Didovic, D. Brauckmann, M. Rani, H. Agrawal, F. U. Schade, Y. Zhang, and S. B. Flohé. 2011. Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 186: 977–986.
  49. Domínguez, P. M., and C. Ardavin. 2010. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol. Rev.* 234: 90–104.
  50. Cheong, C., I. Matos, J. H. Choi, D. B. Dandamudi, E. Shrestha, M. P. Longhi, K. L. Jeffrey, R. M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, et al. 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143: 416–429.

# Transient $\beta$ -catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors

Jaris Valencia,\* Carmen Hernández-López,\* Víctor G. Martínez,\* Laura Hidalgo,\* Agustín G. Zapata,<sup>†</sup> Ángeles Vicente,\* Alberto Varas,\*<sup>1</sup> and Rosa Sacedón\*<sup>1,2</sup>

Department of Cell Biology, Faculties of \*Medicine and <sup>†</sup>Biology, Complutense University, Madrid, Spain

RECEIVED MAY 22, 2009; REVISED OCTOBER 8, 2009; ACCEPTED OCTOBER 28, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0509344

## ABSTRACT

Increasing evidence includes Wnt proteins inside the group of master-signaling pathways that govern immune and nonimmune differentiation systems, fundamental for normal development and homeostasis. Although their precise functions in bone marrow and thymus are still controversial, numerous studies have shown that Wnt signaling is able to control the proliferation of hematopoietic stem cells and thymic progenitors and might also affect their cell-fate decisions and subsequent maturation. In the present work, we analyze the effect of transient stimulation of the canonical Wnt pathway in the differentiation potential of Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> human thymic progenitors, a multipotent and heterogeneous cell population that has the capacity to develop into T cells, NK cells, monocytes, cDC, and pDC. Our results demonstrate that giving a boost to canonical Wnt signaling, triggered by transient exposure to Wnt3a or LiCl, the differentiation capacity of thymic progenitors changes, enhancing NK cell production. On the contrary, Wnt3a- or LiCl-pretreated thymic progenitors generate a significantly lower number of myeloid lineage cells, monocytes, and cDC and exhibit a reduced capacity to differentiate into pDC lineage. As a possible mechanism for this effect, we show that Wnt3a- and LiCl-pretreated progenitors change their membrane levels of receptors for cytokines pivotal for their expansion and differentiation, such as Flt3L. Moreover, canonical Wnt pathway stimulation modifies the transcription factor profile of CD34<sup>+</sup>CD1<sup>-</sup> thymocytes, increasing Hes-1 and ID3 expression levels. *J. Leukoc. Biol.* **87**: 405–414; 2010.

Abbreviations: cDC=conventional dendritic cell(s), Dkk1=Dickkopf homolog 1 (*Xenopus laevis*), DN=double-negative, DP=double-positive, Flt3L=fetal liver tyrosine kinase 3 ligand, FTOC=fetal thymic organ culture(s), Fzd=Frizzled, GNB2L1=guanine nucleotide-binding protein (G-protein),  $\beta$ -polypeptide 2-like 1, GSK-3 $\beta$ =glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , Hes-1=homeobox gene in embryonic stem cell 1, HSC=hematopoietic stem cell(s), ID2/3=inhibitor of DNA binding 2/3, LEF=lymphoid enhancer factor, LiCl=lithium chloride, LPR=lipoprotein-related protein, pDC=plasmacytoid dendritic cell(s), PI=propidium iodide, SCF=stem cell factor, TCF=T cell factor

## Introduction

As reported for other families of morphogens described in the thymus [1], besides being key in the bone marrow, Wnt proteins direct fundamental events during development and tissue renewal, proving the existence of common, basic rules that govern differentiation systems in the embryo and adult organism [2–5]. Wnt signaling pathway is part of the intricate signaling network involved in directing expansion and differentiation of cell progenitors in the thymus [6].

Wnt proteins bind to Fzd receptors that interact with a coreceptor, LPR5 or LPR6 [3]. The Wnt-Fzd-LPR multiprotein complex initiates three possible downstream signaling pathways that can exhibit antagonistic interactions: the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and two noncanonical Wnt pathways such as Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  and RhoA/c-JNK signaling cascades. Wnt signaling output depends on the initial Wnt receptor complex formed, intermediate signaling components, and target cell [7]. The canonical Wnt pathway leads to activation of Dishevelled-1 proteins, which withhold the GSK-3 $\beta$  activity. In the absence of GSK-3 $\beta$  activity,  $\beta$ -catenin is not phosphorylated, and therefore, its ubiquitination and subsequent proteasome degradation are impeded. As  $\beta$ -catenin is synthesized continuously, stabilized  $\beta$ -catenin accumulates in the cytosol and translocates to the nucleus, where it interacts with and coactivates members of the LEF/TCF transcription factor family, leading to the activation of target gene expression [5]. Indeed, these transcription factors act as repressors until they are turned on by  $\beta$ -catenin.

Different experimental approaches have been attempted to elucidate the role of canonical Wnt signaling during T cell differentiation. However, results obtained after deletion of  $\beta$ -catenin and/or  $\gamma$ -catenin in HSC, showing that there are no alterations in thymic populations [8–10], are in conflict with the profound changes observed in hematopoiesis and T cell development after constitutive  $\beta$ -catenin stabilization in HSC [8–12] or CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN thymocytes [13, 14]. The analysis of TCF-1 and Lef-1 knock-

1. These authors contributed equally to this work.

2. Correspondence: Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail: rosasacedon@med.ucm.es

out mice clearly demonstrated that canonical Wnt transcription factors are crucial for T cell maintenance and differentiation [15–19]. Hence, in thymocytes, TCF-1/Lef interaction with  $\beta$ -catenin turns their function from repressors to transcriptional activators, and the  $\beta$ -catenin–TCF complex promotes, in part, the transcription of certain T lymphocyte-specific genes [20]. In this sense, during T cell differentiation, pre-TCR signaling induces TCF expression, and therefore, Wnt and pre-TCR pathways cooperate to ensure (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) DN3 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) and DN4 cell survival [17]. Accordingly, strategies that lead to attenuation of Wnt signaling impair thymic function in mice. In FTOC, the overexpression of the secreted Wnt inhibitor Dkk1 [21] or soluble Fzd receptors [19] blockades T cell differentiation at the DN stage. A similar result is obtained, increasing the levels of the inhibitor of  $\beta$ -catenin–TCF interaction [22]. On the other hand, Wnt-1/Wnt-4 double-deficiency triggers a reduction of thymic cellularity without affecting the proportions of thymocyte subsets, possibly because of the existence of certain redundancy among Wnt proteins [23]. Canonical Wnt signaling also regulates survival [18, 24, 25], maturation [14], and selection of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP cells in the thymus [26, 27].

Human thymic CD34<sup>+</sup> cell progenitors express Fzd receptors and LPR5/6 coreceptors and represent the thymocyte subset with the highest levels of total and active (no phosphorylated)  $\beta$ -catenin [21]. Analysis by DNA microarrays of Wnt target genes in the CD34<sup>+</sup> thymic cell subset indicates that activation of the canonical Wnt pathway regulates the expression of genes involved in cell adhesion, proliferation, and cell survival [28]. However, until our knowledge, no study has analyzed the possible implication of Wnt signaling during early differentiation events of thymic CD34<sup>+</sup> cell progenitors. This population can be subdivided according to CD1a expression; most immature thymocytes are included in the Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cell subset, and CD1a expression correlates with T cell commitment. The next differentiation stage lacks CD34 antigen, expresses the CD4 marker (CD4<sup>imm</sup>), and proceeds to the DP thymocyte population, which suffers selection processes and differentiates into CD4 or CD8 T cells [29].

The thymic microenvironment largely promotes stem cell differentiation into T cell lineage, providing adequate Notch ligands and soluble signals to hematopoietic progenitors that colonize the thymus [1, 30]. Nevertheless, it is important to note that most immature thymic progenitors (CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> subset) include multipotent cells, which in addition to developing into T cells, have the capacity to differentiate in the thymus toward NK cells, monocytes, and cDC or pDC [31, 32]. The current work was undertaken to address the possible influence of Wnt signaling in thymic lineage output. We demonstrated that a pulse of canonical Wnt signaling modifies the differentiation capacity of CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> thymic progenitors, mainly promoting NK lineage differentiation, while reducing monocyte, cDC, and pDC production. Modifications in cytokine receptor expression levels in thymic progenitors and the expression profile of transcription factors could account for these effects.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of human thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells

Human thymus samples from patients aged 1 month to 3 years undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guide-

lines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Montepíncipe and 12 de Octubre Hospitals (Madrid, Spain). Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of the surrounding connective tissue and then disrupted gently with a Potter homogenizer until disaggregated completely. Thymic cell suspensions were first enriched in immature thymocytes by using the sheep RBC rosetting technique, and the recovered cells were then depleted of T, B, NK, myeloid, and DC by treatment with saturating concentrations of anti-CD3 (HIT3a), anti-CD4 (RPA-T4), anti-CD19 (HIB19), anti-CD56 (B159), anti-CD11c (B-ly6), anti-CD14 (M5E2), and anti-CD13 (WM15; all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA) bound to sheep anti-mouse Ig-coated magnetic beads (Dynabeads, DYNAL, Oslo, Norway) as described previously [33]. This CD34<sup>+</sup> cell suspension, whose purity was >95%, was next depleted of CD1a-positive cells following a similar procedure but now using anti-CD1a antibodies. The purity of the recovered Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells was >95%.

### Flow cytometry

The following mAb conjugated with FITC, PE, Cychrome, and APC were used for flow cytometric analysis: CD1a (HI149), CD4 (SK3), CD8a (SK1), CD11c (B-ly6), CD14 (M5E2), CD34 (8G12), CD45RA (HI100), CD56 (B159), CD117 (YB5.B8), CD123 (7G3, 9F5), CD127 (R34.34), and HLA-DR (G46-6; all from BD Biosciences); CD13 (TüK1) and CD135 (BV10A4H2; Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA); CD122 (MIK- $\beta$ 1; ImmunoTools, Friesoythe, Germany); CD314/NKG2D (1D11) and CD94 (DX22; BioLegend, San Diego, CA, USA); and CD303/BDCA-2 (AC144; Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany). For the intracellular staining of total  $\beta$ -catenin in freshly isolated thymocyte subpopulations, cells were counterstained to distinguish different subsets, fixed, and permeabilized using Cytotfix/Cytoperm solution, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with FITC-conjugated anti- $\beta$ -catenin mAb (14, BD Biosciences). For the intracellular staining of phosphorylated STAT5, cells were treated with Cell Fix and Perm Buffer III (BD Biosciences) and stained with Alexa Fluor 488-conjugated anti-human phospho-STAT5 (Tyr<sup>694</sup>) (BD Biosciences). Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Microscopía y Citometría (Complutense University, Madrid, Spain).

### Transient stabilization of $\beta$ -catenin

Purified thymic Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> precursors were treated with murine recombinant Wnt3a at a concentration of 100 ng/ml (Chemicon International, Temecula, CA, USA) or with 10 mM LiCl (Sigma, Spain) for 12 h in Yssel's medium supplemented with 5% FCS (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma, Spain). Control CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> human thymic progenitors were cultured in parallel in the absence of treatment. For the intracellular staining of active  $\beta$ -catenin and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cell Fix and Perm Buffer III (BD Biosciences) to avoid the action of phosphatases, which could increase the level of nonphosphorylated  $\beta$ -catenin unspecifically. Then, cells were stained with anti-human active  $\beta$ -catenin mAb (8E7) [11] (Millipore Ibérica, Madrid, Spain), followed by PE-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA).

### Cell differentiation assays

After 12 h of pretreatment, thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors were washed gently prior to their use in several differentiations assays:

**Chimeric human-mouse fetal thymic organ cultures.** Thymic lobes derived from 15-day-old embryos of SCID mice were cocultured with  $2.5 \times 10^4$  control or pretreated thymic human progenitors by the hanging drop method for 48 h, followed by culture of the recolonized lobes in FTOC for 10–11 days, as described previously [34].

**Generation of NK cells in IL-15 and SCF-supported cultures of thymic precursors.** Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells ( $10^5$ ) were cultured for 13–14 days in 100  $\mu$ l RPMI-1640 medium (Sigma, Spain) supplemented with 10% FCS, 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml strep-

tomyacin (complete RPMI 10%) in a 96-well flat-bottom plate in the presence of the following cytokines: IL-15 (100 ng/ml; ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Rehoboth, Israel) and SCF (100 ng/ml; Fitzgerald Industries International, Concord, MA, USA). One-third of the medium volume was changed every 5 days.

**Coculture with ST2 cells.** The development of CD14<sup>+</sup>, cDC, and pDC was assessed by coculturing  $1 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> human progenitor cells with  $5 \times 10^4$  ST2 cells, a stromal cell line from mouse bone marrow (provided by Dr. Maria Luisa Gaspar, Centro Nacional de Microbiología, CNM, Madrid, Spain). One day before their use in coculture experiments, ST2 cells were plated in 24-well tissue-culture plates. Culture medium consisted of complete RPMI 10%, supplemented with 5 ng/ml recombinant human IL-7 (NIBSC, Hertfordshire, UK) and 5 ng/ml recombinant human Flt3L (Fitzgerald Industries International). To determine whether the ST2-generated pDC were able to secrete IFN- $\alpha$ , on day 10, pDC were stimulated by adding 5  $\mu$ g/ml CpG oligodeoxynucleotide (CpG 2216; ggGGGAC-GATCGTCgggggG; Sigma-Genosys Ltd., Cambridgeshire, UK) to the cocultures for 12 h. IFN- $\alpha$  production was detected by intracellular staining using anti-IFN- $\alpha$  (LT27:295; Miltenyi Biotec) after blocking protein secretion with 5  $\mu$ g/ml Brefeldin-A (Sigma, Spain). CpG2243 (ggGGGAGCAT-GCTCgggggG; Sigma-Genosys) was used as negative control.

### Apoptosis assays

The percentage of apoptotic cells was determined by staining with Annexin-V-FITC (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), according to the supplier's instructions. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and gated according to forward-scatter, side-scatter, and their ability to exclude PI. Apoptotic cells were defined as Annexin-V-positive and PI-negative.

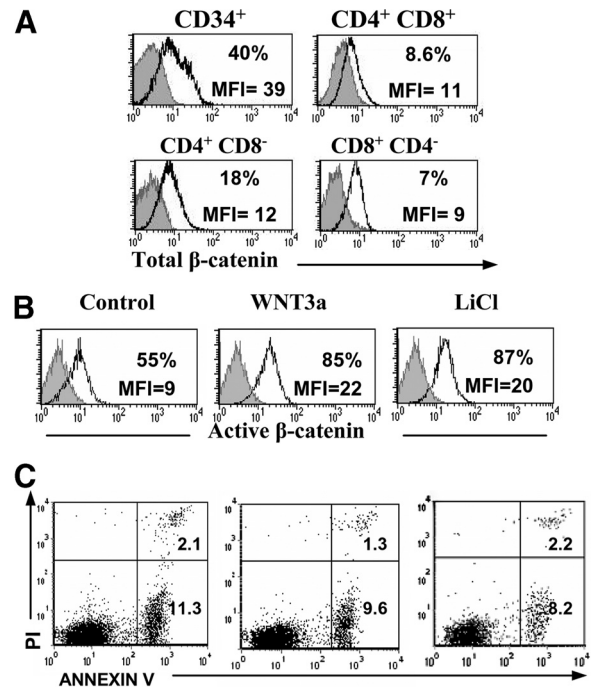
### Real-time quantitative RT-PCR

RNA isolation was performed using Absolutely RNA Microprep kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA), including a DNase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized by the High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the supplier's instructions, and then used as target in the PCR amplifications. Real-time PCR was performed with the following TaqMan assays: Spi-B (Hs00162150\_m1), Hes-1 (Hs00172878\_m1), Gata-2 (Hs00231119\_m1), Gata-3 (Hs00231122\_m1), PU.1 (Hs00231368\_m1), ETS1 (Hs00428287\_m1), ID2 (Hs00747379\_m1), and ID3 (Hs00171409\_m1; all from Applied Biosystems). GAPDH (Predeveloped TaqMan) and GNB2L1 (Hs00272002\_m1) were used as endogenous controls. All PCR reactions were set in duplicates using the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7.900HT Fast Real-Time PCR system (Centro de Genómica, Complutense University).

## RESULTS

### Activation of canonical Wnt signaling with Wnt3a or LiCl treatment triggers transient stabilization of $\beta$ -catenin in human thymic progenitors

In the human thymus, canonical Wnt signaling occurs in all differentiation subsets, from DN thymocytes, where it is most prominent, to more mature populations [21]. Thus, according to data reported previously [21], we observed the highest levels of total  $\beta$ -catenin in the human thymus in the total DN CD34<sup>+</sup> fraction (Fig. 1A). However, it would be reasonable to hypothesize that not all of CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors must express the active form of  $\beta$ -catenin. To determine the percentage of human thymic progenitors that contain this form of  $\beta$ -catenin, we stained freshly isolated Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells with an antibody that specifically



**Figure 1. Wnt-3a and LiCl treatment promotes  $\beta$ -catenin stabilization in human thymic progenitors and increases their survival slightly.** (A) Expression of total  $\beta$ -catenin in freshly isolated human thymic subsets defined by the surface expression of CD4, CD8, and CD34 molecules. (B) Intracellular levels of nonphosphorylated (Active)  $\beta$ -catenin were determined by flow cytometry in CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells cultured for 12 h with Wnt-3a (100 ng/ml) or LiCl (10 mM) or with culture medium (Control). Data are representative of three independent experiments. Shadow histograms indicate background fluorescence. The percentage of positive cells, determined according to background staining, and the total mean fluorescence intensity (MFI) are shown in each histogram. (C) To determine the percentage of apoptotic cells, the recovered cells were stained with Annexin-V and PI. Dot plots show the percentage of apoptotic cells (Annexin-V<sup>+</sup> PI<sup>-</sup>). Data are representative of three independent experiments.

recognizes the nonphosphorylated form of  $\beta$ -catenin. Flow cytometry analysis showed that 40–60% of freshly isolated CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> thymocytes expressed detectable levels of active  $\beta$ -catenin, suggesting that canonical Wnt signaling is regulated tightly in vivo. To give a boost to the canonical Wnt signaling pathway in thymic progenitors and exceed transiently usual signaling levels, we treated CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells for 12 h with Wnt3a (100 ng/ml), which has been described as a prototypical agonist for the canonical pathway in the thymus, and alternatively, with LiCl (10 mM), which inhibits GSK-3 $\beta$  and reduces the degradation of  $\beta$ -catenin by the proteasome [19]. After the cell culture, we corroborated by flow cytometry that the treatment with Wnt3a or LiCl produced a prominent increment of active  $\beta$ -catenin levels in most CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitor cells, detecting active  $\beta$ -catenin in 80–90% of treated cells (Fig. 1B), and cells cultured under control conditions showed similar levels of  $\beta$ -catenin than those found in fresh, isolated cells. We obtained similar results after 3 h of treatment (data not shown), suggesting that canonical Wnt signaling begins within the first hours of culture.

Previously reported data suggest that the Wnt signaling pathway is important for regulating cell survival of immature thymocytes [18, 24]. So, we next evaluated the effect of canonical Wnt signaling in the viability of CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors, and we stained Wnt3a- or LiCl-treated cells with Annexin-V and PI. Flow cytometry analysis showed no toxic effect of Wnt3a or LiCl, as after 12 h of treatment, the percentage of PI<sup>+</sup> cells did not increase. On the contrary, we observed a slight decrease in the proportion of apoptotic cells (Annexin<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) in response to canonical Wnt signaling (Fig. 1C).

**Differentiation of Wnt3a- and LiCl-pretreated thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> precursors in human-mouse chimeric FTOC**

We next analyzed the possible effect of a transient stimulation of canonical Wnt-β-catenin signaling on lineage output from pretreated thymic progenitors, assaying pretreated cells in various specific differentiation systems.

We started using CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells, pretreated with LiCl and Wnt3a, to perform human-mouse chimeric FTOC, which provide a thymic microenvironment and promote largely T cell differentiation. After 10–11 days of culture—when we compared the numbers of human cells recovered from lobes colonized with Wnt3a-pretreated cells with those obtained from control lobes—we observed a wide variability in the effects (Fig. 2A), which led to the absence of significant differences. By contrast, the numbers of recovered cells from

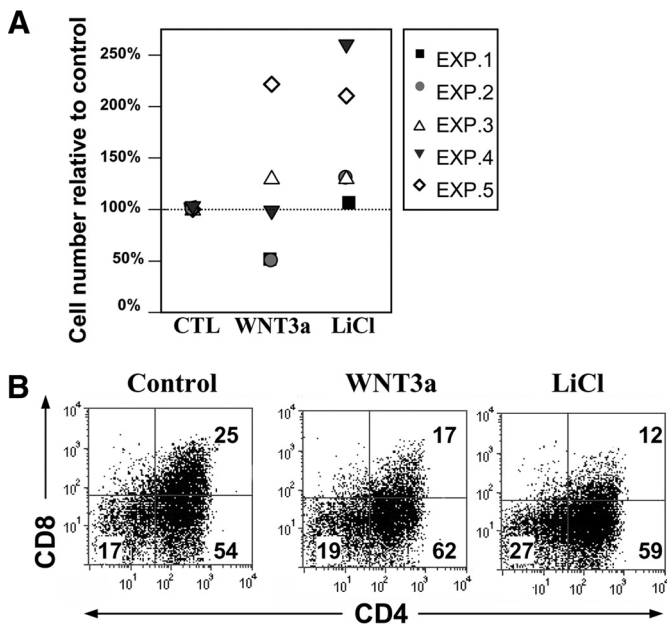
chimeric FTOC seeded with LiCl-pretreated progenitors were always higher than those collected from their controls. Nevertheless, there were notable variations in the magnitude of the increment found in the five experiments analyzed, and increases in the number of human cells recovered ranged from 10% to 170% (Fig. 2A).

Regarding T cell differentiation, at this time of culture, in control FTOC, approximately 25% of thymocytes had reached the DP differentiation stage, but most of the cells were within the intermediate CD4<sup>imm</sup> population, and approximately 15% of thymic cells remained within the most immature DN thymocyte subset. In all of the experiments analyzed, thymic lobes, colonized with Wnt3a-pretreated precursors, showed a slight reduction in the proportion of DP thymocytes (Fig. 2B). LiCl pretreatment induced an important increase in the percentage of DN cells, and concomitantly, the proportion of DP thymocytes halved with respect to control FTOC. Nonetheless, as the numbers of human cells recovered from FTOC recolonized with LiCl-pretreated precursors were increased, in absolute terms, the reduction in the DP cell population was not statistically significant. By contrast, the increment in the number of human DN thymocytes yielded after LiCl pretreatment was between 40% and 500% (data not shown).

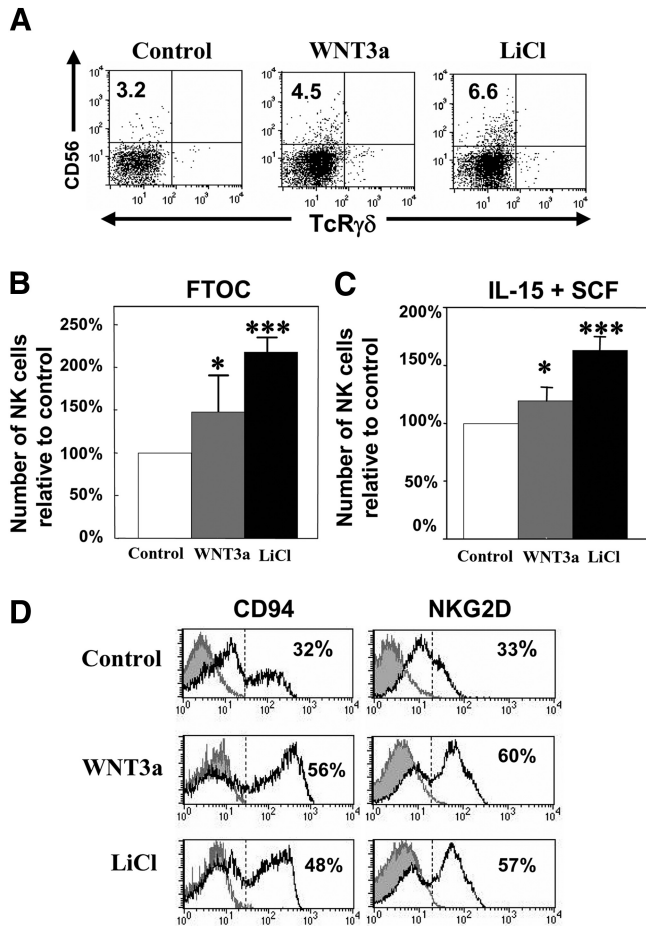
**Transient stimulation of Wnt signaling enhances differentiation of thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells to NK lineage**

Chimeric human-mouse FTOC yielded a small percentage of NK cells, defined by the expression of the CD56 marker, which ranged in control cultures between 2% and 5% of total human cells, depending on the experiment. Remarkably, the percentage and the absolute number of NK cells recovered from FTOC, seeded with Wnt3a- or LiCl-pretreated cells, augmented with respect to their control counterparts in all of the experiments (Fig. 3, A and B). In the case of Wnt3a pretreatment, the increase in the percentage of NK cells relative to the control cultures varied between 45% and 65% and in cultures seeded with LiCl-pretreated progenitors, reached 120% (Fig. 3A). The absolute number of human NK cells recovered from chimeric FTOC was also higher when the thymic progenitor had been pretreated to stabilize β-catenin before seeding thymic lobes, and again, LiCl pretreatment triggered the greatest effects (Fig. 3B).

As the above results suggest that Wnt3a or LiCl pretreatment of thymic precursors might be able to enhance their differentiation into NK cells, we tried to corroborate those data, performing a differentiation assay specific to NK cell production. After 13–15 days of culture in the presence of SCF and IL-15, we collected 70–90% of CD56<sup>+</sup> cells, and supporting results found with FTOC assays, activation of canonical Wnt signaling increased the subsequent yield of NK cells from thymic progenitors (Fig. 3C). Moreover, the analysis of the expression of CD94 and NKG2D receptors in CD56<sup>+</sup> cells obtained from these cultures demonstrated a significantly higher proportion of CD94- and NKG2D-positive cells in cultures seeded after Wnt3a or LiCl pretreatment, which suggests an earlier acquisition of these receptors as a result of transient stabilization of β-catenin (Fig. 3D).



**Figure 2. Stimulation of canonical Wnt signaling increases the number of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> thymocytes from human-mouse chimeric FTOC.** (A) The scatter plot shows the number of human cells recovered after 11 days of culture from human-mouse chimeric FTOC seeded with Wnt3a- or LiCl-pretreated progenitors, relative to those seeded with control cells (referred as 100%). The number of human cells (CD45<sup>+</sup>) recovered from cultures seeded with pretreated progenitors in each experiment was divided by the number of cells recovered from its control culture to give the relative cell number of five individual experiments. (B) Dot plots show CD4 versus CD8 expression on gated human CD45<sup>+</sup> cells from 11-day cultures. Data are representative of five independent experiments.



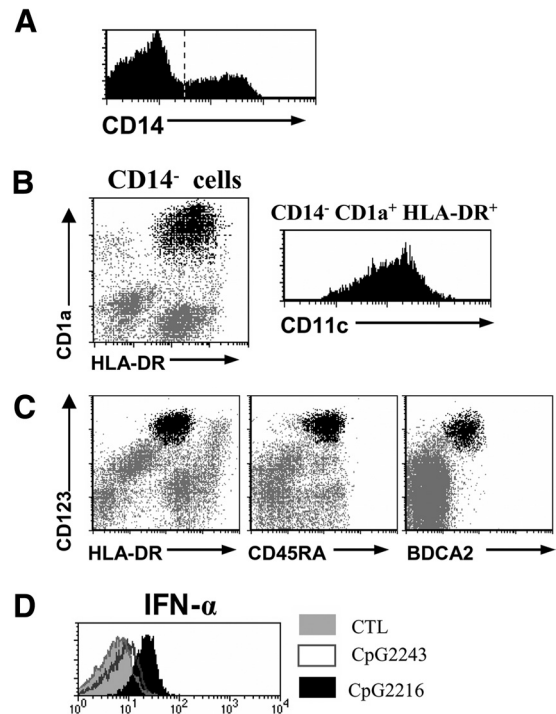
**Figure 3. Transient stabilization of  $\beta$ -catenin enhances differentiation of thymic  $CD34^+CD1a^-$  cells to NK lineage.** (A) Expression of CD56 and TCR $\gamma\delta$  on  $CD45^+$  human cells recovered from human-mouse chimeric FTOC cultured for 11 days. Data are representative of five independent experiments. (B and C) Numbers of human  $CD56^+$  NK cells recovered from 11-day FTOC (B) or after 14 days of culture with SCF and IL-15 (C) seeded with Wnt3a- or LiCl-pretreated progenitors relative to their counterparts seeded with control cells (referred as 100%). Data represent the mean ( $\pm$ SD) of four independent experiments (\*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ , by *t*-test single sample). (D) Expression of CD94 and NKG2D receptors in  $CD56^+$  cells yielded from control or Wnt3a/ LiCl-pretreated thymic cell progenitors after 13 days of culture with SCF and IL-15. Shadow histograms indicate background fluorescence. The percentages of positive cells, determined according to background staining, are shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments.

### The capacity of thymic progenitors to differentiate into monocytes, cDC, and pDC is reduced significantly after activation of canonical Wnt signaling

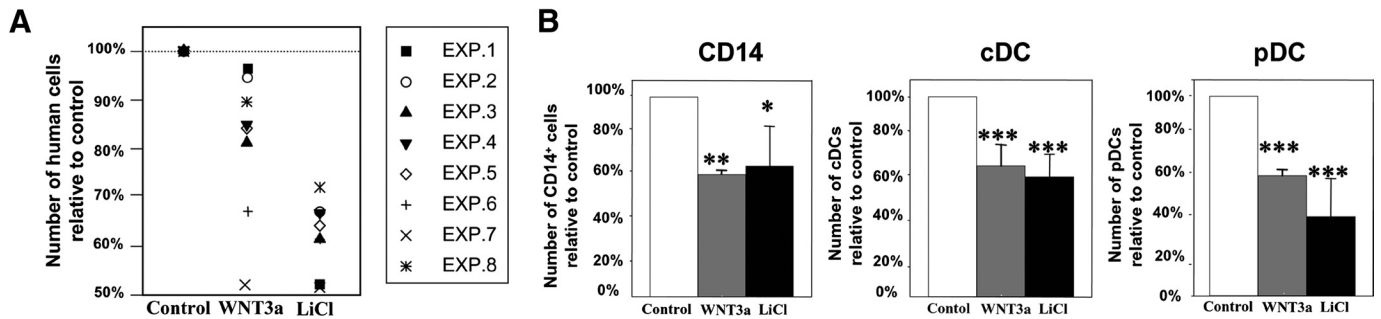
We next analyzed the impact of giving a boost to canonical Wnt signaling in the differentiation of thymic progenitors toward monocytes, cDC, and pDC. We used a modification of an *in vitro* assay described previously by Spits et al. [35], which allowed us to study the differentiation of  $CD34^+CD1a^-$  cells into those three lineages. In our experiments, we cocultured pretreated human thymic progenitors with ST2 cells in the

presence of IL-7 and Flt3L cytokines during 10–11 days. Under these conditions, a population of  $CD14^+$  cells, which were considered to be monocytes, was generated (Fig. 4A), and within the population of  $CD14^-$  cells, we found cDC, as defined by the expression of the markers CD1a, CD11c, and HLA-DR (Fig. 4B). Cocultures of thymic progenitors and ST2 stromal cells also yielded a variable percentage of HLA-DR<sup>low</sup>CD123<sup>hi</sup>CD45RA<sup>+</sup>BDCA-2<sup>+</sup> pDC (Fig. 4C), which had the ability to produce IFN- $\alpha$  after stimulation (Fig. 4D).

Using this experimental approach, we observed that cocultures seeded with human thymic progenitors, which had been pretreated to stabilize  $\beta$ -catenin, yielded a significantly reduced number of cells in comparison with their controls (Fig. 5A). It is important to note that we found this effect in all of the experiments performed with Wnt3a- or LiCl-pretreated progenitors. Remarkably, the reduction in cell number was more evident after LiCl pretreatment (percentage reduction between 30% and 50%). Regarding lineage output, both pretreatments produced a decrease in the absolute number of  $CD14^+$  cells, but whereas pretreatment with Wnt3a resulted in a quite constant reduction ( $\sim 40\%$ ), the results obtained after LiCl pretreatment were more vari-



**Figure 4. Phenotype of  $CD14^+$ , cDC, and pDC populations generated from  $Lin^-CD34^+CD1a^-$  thymic progenitors cocultured with ST2 stromal cells.** After 11 days of coculture, as described in Materials and Methods, the phenotype of recovered cells was analyzed by flow cytometry. (A)  $CD14^+$ , monocytes. (B)  $CD14^-HLA-DR^+CD11c^+$ , cDC. (C) HLA-DR<sup>low</sup>CD45RA<sup>+</sup>BDCA2<sup>+</sup>CD123<sup>high</sup>, pDC. Data are representative of five independent experiments. (D) After 11 days of coculture, pDC were stimulated for 12 h with CpG (2216; 5  $\mu$ g/ml; black histogram), using as negative control CpG2243 stimulation (open histogram). Flow cytometric analysis was performed after intracellular staining of IFN- $\alpha$ , as described in Materials and Methods. Gray histogram indicates background staining.



**Figure 5. Reduced capacity of thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors to differentiate into monocytes, cDC, and pDC after stimulation of canonical Wnt signaling.** (A) The scatter plot shows the total number of human cells recovered from cocultures of Wnt3a- or LiCl-pretreated human progenitors with murine bone marrow stromal cell line ST2, expressed as relative percentage to their control counterparts, from eight individual experiments. (B) The numbers of CD14<sup>+</sup> cells, cDC, and pDC recovered from cocultures performed with Wnt3a (gray bars)- or LiCl (black bars)-pretreated progenitors are shown. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of five to eight independent experiments, expressed relative to the numbers recovered under control conditions (open bars; referred as 100%). \*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ , by *t*-test single sample.

able, and we found reductions ranging from 15% to 60% in the five experiments performed. cDC also underwent a significant reduction in their numbers in cocultures seeded with pretreated human precursors. However, the impact of the pretreatment was significantly higher in the case of pDC, leading in all of the experiments to a decrease in the percentage and number of this cell population, which indicates a greater negative effect of  $\beta$ -catenin stabilization on pDC generation (Fig. 5B).

**Stimulation of canonical Wnt pathway modifies the expression of cytokine receptors in thymic Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors**

Differentiation and expansion of thymic precursors depend on their response to cytokines, such as SCF, IL-7, Flt3L, and IL-15. Therefore, we studied the pattern of expression of their receptors (CD117, CD127, CD135, and CD122, respectively) on Wnt3a- and LiCl-pretreated CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors as a possible cause for the results obtained after transient stabilization of  $\beta$ -catenin.

After 12 h of culture in control conditions, 50–60% of Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells expressed in their membrane receptors for SCF (CD117), whereas the percentage of CD127<sup>+</sup> or CD135<sup>+</sup> progenitors was higher, corresponding to 65% and 75% of CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells, respectively. On the other hand, CD122 expression was restricted to a minor proportion of cell progenitors, which represented <5% of this thymic population (Fig. 6A). As a result of the transient stabilization of  $\beta$ -catenin, we observed that the progenitors did not change their expression of CD117, whereas there was a decrease in the percentage of CD34<sup>+</sup> cells expressing Flt3 on their cell surface, most noticeably in the precursors treated with LiCl. By contrast, the percentage of CD122-positive cells increased after Wnt3a or LiCl treatment, reaching approximately 10% of cell precursors, and Wnt3a but not LiCl treatment increased the proportions of CD127<sup>+</sup> thymic cell progenitors (Fig. 6A).

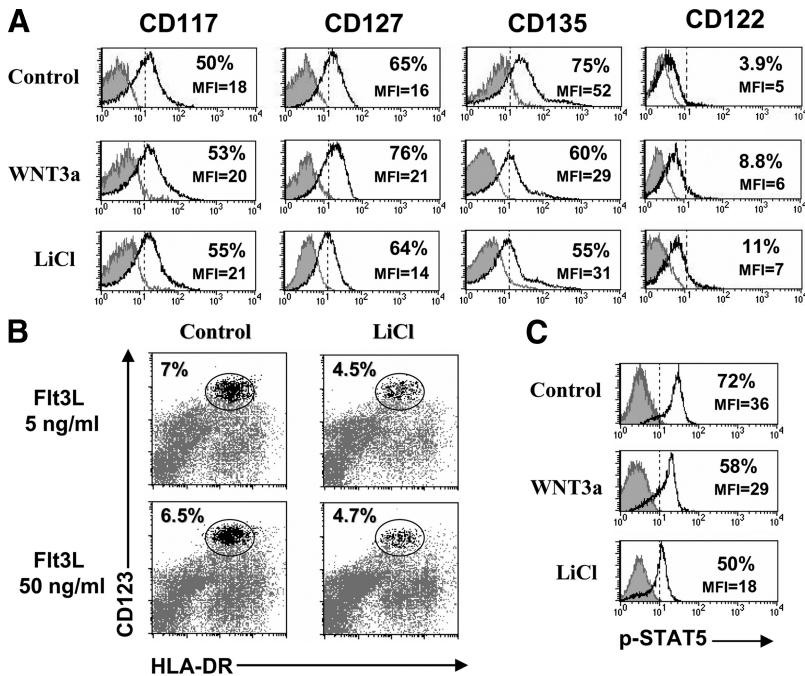
As the cytokine Flt3L is a crucial factor to promote the development of cDC and pDC in vivo and in vitro [36, 37], and the expression of its receptor is notably reduced after treatment with

Wnt3a or LiCl, we considered the possibility that the significant reduction observed in the number of recovered cells from cocultures established with ST2 cells and pretreated progenitors could be reversed, increasing Flt3L doses. However, the results obtained from these additional experiments showed that even tenfold increases in concentration of Flt3L failed to reverse the reduction in the absolute number of cells, as well as the percentage of pDC recovered from cocultures seeded with progenitors pretreated with LiCl (Fig. 6B). Furthermore, corroborating the conclusion that transient stabilization of  $\beta$ -catenin induced a loss of Flt3L responsiveness in CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells, we demonstrated that the down-regulation of Flt3 expression observed in thymic progenitors correlated to the inhibition of Flt3L-induced STAT5 phosphorylation [38, 39] in Wnt3a- and LiCl-pretreated thymic progenitors (Fig. 6C).

**CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors change their transcription factor profile in response to  $\beta$ -catenin stabilization**

In CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> thymic progenitors, we evaluated by quantitative RT-PCR whether transient  $\beta$ -catenin stabilization affected the expression of different transcription factors that determine their lineage output [40]. Variations between samples were corrected by normalizing against the expression of two endogenous controls, GAPDH and GNB2L1. The results obtained showed that the stabilization of  $\beta$ -catenin caused by treatment with LiCl did not affect the levels of transcripts for Spi-B, GATA-2, GATA-3, and ID2 genes significantly, and those for ETS1 decreased only slightly when compared with control cells. In contrast, LiCl treatment caused a 50% increase in the levels of transcripts for Hes-1 and PU.1 in thymic progenitors, and remarkably, the amount of ID3 transcripts doubled that found in control cells (Fig. 7A).

To emphasize the impact of LiCl pretreatment, we performed additional assays to compare the transcription factor profile of control and LiCl-pretreated progenitors after responding to differentiation signals. In this set of experiments, RNA was obtained after two consecutive culture periods. The first culture step was equivalent to that performed in previous experiments; hence, the progenitors were maintained under control conditions or in the



**Figure 6. (A)** Cytokine receptor expression after transient stimulation of canonical Wnt signaling in thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors. After 12 h of culture in the absence (Control) or presence of Wnt3a or LiCl treatment, CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors were stained with anti-CD117, anti-CD127, anti-CD135, and anti-CD122 and then analyzed by flow cytometry. Shadow histograms indicate background fluorescence. The percentage of positive cells, determined according to background staining, and the total mean fluorescence intensity are shown in each histogram. Data are representative of four independent experiments. **(B)** High doses of Flt3L failed to reverse the reduction of the pDC population from cocultures of LiCl-pretreated progenitors and ST2 cells. Cocultures of thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> control or LiCl-pretreated progenitors and ST2 cells were performed with different concentrations of Flt3L (5 ng/ml or 50 ng/ml), as described in Materials and Methods. Dot plots show the percentage of pDC (CD123<sup>high</sup>HLA-DR<sup>low</sup>) recovered from these cocultures, where in the case of 5 ng/ml, the number of human cells recovered from LiCl-pretreated cocultures was 80% of control cocultures, whereas in the case of 50 ng/ml, it was 60% of control. Data are representative of three independent experiments. **(C)** Transient stabilization of  $\beta$ -catenin inhibits Flt3L-induced STAT5 phosphorylation (p-STAT5) in CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> cells. Control and Wnt3a- and LiCl-pretreated progenitors were cultured in the presence of 100

ng/ml Flt3L, and after 3 h, intracellular STAT5 tyrosine phosphorylation levels were analyzed by flow cytometry. Shadow histograms indicate background fluorescence. The percentage of positive cells, determined according to background staining, and the total mean fluorescence intensity are shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments.

presence of LiCl for 12 h, whereas during the second culture step, control or LiCl-pretreated progenitors responded to IL-7, Flt3L, and SCF cytokine cocktail for only 6 h. Under these experimental conditions, the increment in transcripts for Hes-1 was maintained, but remarkably, the levels of transcripts for ID3 and GATA3 were two to three times higher in cells that had stabilized  $\beta$ -catenin before responding to the IL-7, Flt3L, and SCF cytokine cocktail. Moreover, ID2 levels in pretreated cells were also increased by 40% with respect to control progenitors (Fig. 7B). It is interesting to remark that control progenitors could largely differentiate to monocyte and DC lineages in response to these differentiation signals, whereas our previous results indicated that pretreated progenitors did not.

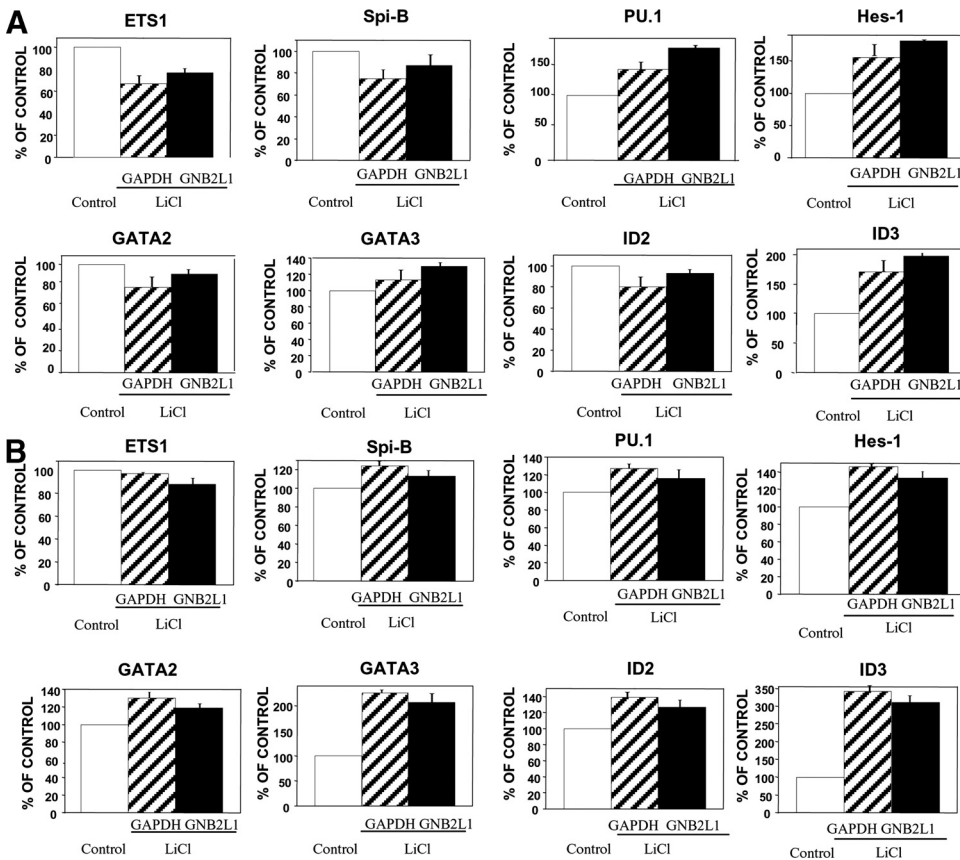
## DISCUSSION

In the present work, we have shown that stimulation of canonical Wnt signaling in human intrathymic Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitors modifies their subsequent lineage output in response to specific differentiation environments. Our results also indicate that this effect would be related to changes in their expression of the Flt3L receptor, crucial in the regulation of lineage choice and the maintenance/expansion of progenitors and alterations in the expression levels of various transcription factors, such as Hes-1 and ID3.

We have focused our interest in the effects of a transitory increment in  $\beta$ -catenin levels in the differentiation potential of multilineage thymic precursors [41, 42]. During a reduced period of time, we have induced canonical Wnt signaling artificially in a specific cell-differentiation stage, CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> thymic

progenitors, transiently increasing the level of active  $\beta$ -catenin. This experimental strategy allows investigation of the effects that canonical Wnt signaling could exert only on early thymic progenitors, avoiding that the final result can be masked by the diverse effects of Wnt signaling on distinct thymocyte subsets, as could occur with a continuous treatment. In addition, as thymic epithelium [43] and ST2 stromal cells [44] respond to Wnt signaling, we perform the treatment of thymic progenitors before their use in FTOC or cocultures to avoid affecting the differentiation of thymic progenitors through modifications in the stromal microenvironment.

Previous studies performed in mice have attempted to analyze the function of canonical Wnt signaling during T cell differentiation, obtaining conflicting results. The genetic strategies used in these studies, leading to sustained activation or impairment of canonical Wnt signaling, produced distinct results depending on the target gene and the stage of thymocyte differentiation that underwent the genetic modification [13, 14, 24, 45]. Therefore, activation of the canonical Wnt pathway by overexpressing activated forms of  $\beta$ -catenin led to different effects depending on the promoter that controlled expression of mutant  $\beta$ -catenin [8–12, 26, 27]. Intriguingly, conditional  $\beta$ -catenin deletion under control of the lck promoter impairs T cell development [45], and if this deletion occurs earlier, in HSC, the thymus is not affected [46, 47]. On the other hand, attenuation of Wnt signaling, by overexpression of inhibitory molecules such Dkk1 [19] or Fzd soluble receptors [21], produces a blockage of T cell development at the DN differentiation stage, which becomes total in the case of Dkk1 overexpression. However, in these studies, the possible effects



**Figure 7. Transient stabilization of  $\beta$ -catenin changes the  $CD34^+CD1a^-$  transcription factor profile.** (A) Expression of different transcription factors in LiCl-pretreated progenitors, expressed relative to control values (referred as 100%). Variations between samples were corrected by normalizing against the expression of two endogenous controls, GAPDH (hatched bars) and GNB2L1 (black bars). (B) Quantitative RT-PCR analysis of transcriptional factor expression in  $CD34^+CD1a^-$  cultured for 6 h with IL-7, Flt3L, and SCF after 12 h of pretreatment with LiCl.

on thymic epithelium were not evaluated, and recently, it has been reported that stabilization of  $\beta$ -catenin, exclusively in thymic epithelial cells, blocks thymocyte development [48]. Then, so far, no work has studied the involvement of the canonical Wnt pathway in modulating the differentiation potential of thymic progenitors.

Several authors have also reported that manipulation of canonical Wnt signaling affects expansion and differentiation potential of HSC. Artificial stimulation of the canonical Wnt pathway can restrict differentiation of primitive HSC, maintaining their engraftment potential [49], but sustained autocrine Wnt3a signaling compromises hematopoiesis [50]. Constitutively active  $\beta$ -catenin causes a severe disruption of hematopoiesis [9, 10], leading to exhaustion of a long-term stem-cell pool [10] and affecting myeloid progenitors, erythroid differentiation, and development of common lymphoid progenitors [9]. Accordingly, differentiation of B cells and pDC is blocked completely when primitive HSC are cultured onto Wnt3a-expressing OP9 stromal cells, and cDC development is not compromised, but modifications on OP9 stromal cells could also account for these effects [50].

Our results show that the thymic  $CD34^+CD1a^-$  cell population, which includes the most immature thymic progenitors with the capacity to differentiate into T cells, NK cells, monocytes, and DC, markedly increases the levels of active  $\beta$ -catenin upon treatment with LiCl or Wnt3a, demonstrating the activation of the canonical Wnt signaling route. These pretreated progenitors were used in different experimental approaches to

study their differentiation potential and generated increased numbers of NK cells, whereas by contrast, showed less capacity to expand and differentiate toward monocyte and DC lineages, observing the greatest effect on pDC differentiation. As the activation of canonical Wnt signaling is previous to seed differentiation cultures, in our system, the transient stabilization of  $\beta$ -catenin modifies intrinsic characteristics of the thymic progenitors.

The mechanisms that control lineage output from  $CD34^+$  thymic progenitors involve the integration of signals initiated in response to cytokines and the activity of specific transcription factors. In this scenario, the cytokine Flt3L is sufficient and essential to support the commitment and differentiation of hematopoietic precursors to DC lineage [36, 37], and our results demonstrate that activation of canonical Wnt signaling in  $CD34^+CD1a^-$  progenitors markedly reduces the surface expression of receptors for this cytokine, which results in the inhibition of Flt3L-induced STAT5 phosphorylation. Therefore, the capacity of thymic progenitors to proliferate or survive in response to Flt3L, and in correlation, its potential to differentiate into monocytes, cDC, and pDC would be compromised after  $\beta$ -catenin stabilization. Consequently, this effect could account for the reduction observed in the number of cells yielded from the monocyte-DC differentiation assays, despite the increased viability of thymic progenitors. The reduction in Flt3 expression could merely decrease the sensitivity of progenitors to this signal, or in contrast, the reduced percentage of Flt3<sup>+</sup> cells would be reflecting a modification in the compo-

sition of the thymic progenitor subpopulation after activation of canonical Wnt signaling. The increment in the percentage of CD122-positive progenitors observed after Wnt3a and LiCl pretreatment could agree with this possibility and with the enhancement of NK cell differentiation. Interestingly, we demonstrate that this effect is not reverted by increasing Flt3L doses and also show that the levels of various transcription factors are modified after activation of the canonical Wnt pathway.

Among transcription factors whose expression changes after giving a boost in canonical Wnt signaling, ID3, whose levels in LiCl-treated progenitors double those found in control, non-treated cells, stands out. ID3 is an inhibitor of the transcriptional activity of E2A proteins, E12 and E47, involved in the differentiation of many cell types. Enforced expression of ID3 by retrovirus-mediated gene transfer inhibits the development of CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> thymic progenitors into T cells and pDC and enhances the production of NK cells [35, 51]. In agreement, in our system, the transient activation of  $\beta$ -catenin enhances NK yields from human thymic progenitors and reduces the production of pDC. However, although FTOC seeded with LiCl-pretreated progenitors yield higher numbers of DN thymocytes, we cannot affirm conclusively that T cell lineage is affected. Nevertheless, the increment of ID3 levels generated after retroviral transduction, besides being constitutive, could be higher than that induced after transient Wnt signaling activation. In any case, the effect of canonical Wnt signaling in thymic progenitors is not merely an increment in ID3 transcripts. We also find an increment in the level of Hes-1 transcripts. Previous reports have demonstrated that the canonical Wnt pathway enhances Notch signaling, increasing the amount of Notch1 intracellular domain, which triggers an increment in Hes-1 transcription [52, 53]. In addition, Wnt signaling activation promotes the transcription of Notch1 [12] and its ligand Jagged1 [54], which in turn, would augment the subsequent Notch-dependent response. The increment in Notch1 signaling could be one of the factors that causes the inhibition of myeloid differentiation and the increment in the thymic DN population observed after activation of  $\beta$ -catenin [42].

Regarding NK cell development, cord-blood CD34<sup>+</sup> cells cultured with low densities of Delta1<sup>ext-IgG</sup> fusion proteins, which induce a small increase in Hes-1 expression [55], generate higher numbers of NK cells than progenitors cultured without fusion proteins [53]. In contrast, elevated densities of Delta1 [53] or sustained Notch1 activation after the intracellular portion of the Notch receptor 1 retroviral transduction [42] result in blockage of NK cell differentiation. These results indicate that the intensity of Notch signaling regulates NK lineage commitment and differentiation and account for the existence of an optimal level of Notch signaling required for the promotion of NK development. Accordingly, Wnt3a can inhibit NK cell differentiation by enhancing the level of Notch1 signaling to exceed a threshold that favors T cell development [53]. The increment in Hes-1 levels observed in LiCl-treated progenitors is quite low compared with that reported after culturing CD34<sup>+</sup> progenitors with Delta1<sup>ext-IgG</sup> fusion proteins [55]; then, we can assume that does not exceed the optimal level for NK differentiation.

On the other hand, controversial results have been reported regarding Notch1 signaling and pDC differentiation, mainly as a result of differences in the origin of CD34<sup>+</sup> cell progenitors used in these studies (cord blood vs. thymus) and the amount of Notch1 ligand provided to CD34<sup>+</sup> progenitors. Thus, Dontje et al. [56] demonstrated that CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> thymic progenitors cultured onto the OP9 stromal cell line expressing human Delta-like 1 increase GATA-3 expression and down-modulate Spi-B blocking pDC differentiation. In contrast, Olivier et al. [57] showed that cord-blood CD34<sup>+</sup> progenitors require Notch1 signaling to differentiate into pDC and are blocked after  $\gamma$ -secretase inhibition, and their culture onto OP9-DL1 cells increases pDC yields.

In conclusion, we show that transient stabilization of  $\beta$ -catenin alters the lineage output from CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> thymic progenitors, impairing their capacity to differentiate into monocyte or DC lineages while promoting NK cell production. Modifications in factors that mediate CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> expansion and differentiation, such as the expression of Flt3 or Hes-1 and ID3 transcription levels, account for those results.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2006-00651 and BFU2007-65520 from the Ministerio de Educación y Ciencia, RD06/0010/0003 from the Instituto de Salud Carlos III, GR74/07-910552 from the Universidad Complutense y Comunidad Autónoma de Madrid, and PR34/07-15867 from the Universidad Complutense and Grupo Santander. We thank Dr. F. Villagrà and the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital Madrid-Montepíncipe and Hospital 12 de Octubre for the thymus samples and Dr. M. L. Gaspar for the gift of murine bone marrow stromal cell line ST2.

## REFERENCES

- Melichar, H., Kang, J. (2007) Integrated morphogen signal inputs in gammadelta versus alphabeta T-cell differentiation. *Immunol. Rev.* **215**, 32–45.
- Nusse, R. (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* **15**, 28–32.
- Staal, F. J., Clevers, H. C. (2005) WNT signaling and hematopoiesis: a WNT–WNT situation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 21–30.
- Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469–480.
- Staal, F. J., Luis, T. C., Tiemessen, M. M. (2008) WNT signaling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 581–593.
- Staal, F. J., Clevers, H. C. (2003) Wnt signaling in the thymus. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 204–208.
- Kawano, Y., Kypta, R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2627–2634.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., Weissman, I. L. (2003) A role for Wnt signaling in self-renewal of hematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409–414.
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E., Nerlov, C. (2006) Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat. Immunol.* **7**, 1048–1056.
- Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M. M., Birchmeier, W., Tenen, D. G., Leutz, A. (2006) Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive  $\beta$ -catenin activation. *Nat. Immunol.* **7**, 1037–1047.
- Baba, Y., Garrett, K. P., Kincade, P. W. (2005) Constitutively active  $\beta$ -catenin confers multilineage differentiation potential on lymphoid and myeloid progenitors. *Immunity* **23**, 599–609.

12. Baba, Y., Yokota, T., Spits, H., Garrett, K. P., Hayashi, S., Kincade, P. W. (2006) Constitutively active  $\beta$ -catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture. *J. Immunol.* **177**, 2294–2303.
13. Gounari, F., Aifantis, I., Khazaie, K., Hoeflinger, S., Harada, N., Taketo, M. M., von Boehmer, H. (2001) Somatic activation of  $\beta$ -catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat. Immunol.* **2**, 863–869.
14. Mulroy, T., Xu, Y., Sen, J. M. (2003)  $\beta$ -Catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *Int. Immunol.* **15**, 1485–1494.
15. Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H. R., Clevers, H. (1995) An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* **374**, 70–74.
16. Schilham, M. W., Wilson, A., Moerer, P., Benaissa-Trouw, B. J., Cumano, A., Clevers, H. C. (1998) Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J. Immunol.* **161**, 3984–3991.
17. Goux, D., Coudert, J. D., Maurice, D., Scarpellino, L., Jeannot, G., Piccolo, S., Weston, K., Huelsken, J., Held, W. (2005) Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival. *Blood* **106**, 1726–1733.
18. Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H., Held, W. (2001) The  $\beta$ -catenin-TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat. Immunol.* **2**, 691–697.
19. Staal, F. J., Meeldijk, J., Moerer, P., Jay, P., van de Weerd, B. C., Vainio, S., Nolan, G. P., Clevers, H. (2001) Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur. J. Immunol.* **31**, 285–293.
20. Staal, F. J., Weerkamp, F., Langerak, A. W., Hendriks, R. W., Clevers, H. C. (2001) Transcriptional control of T lymphocyte differentiation. *Stem Cells* **19**, 165–179.
21. Weerkamp, F., Baert, M. R., Naber, B. A., Koster, E. E., de Haas, E. F., Atkuri, K. R., van Dongen, J. J., Herzenberg, L. A., Staal, F. J. (2006) Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3322–3326.
22. Pongracz, J. E., Parnell, S. M., Jones, T., Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2006) Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signaling in early T cell development. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2376–2383.
23. Mulroy, T., McMahon, J. A., Burakoff, S. J., McMahon, A. P., Sen, J. (2002) Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J. Immunol.* **32**, 967–971.
24. Hsu, W., Shakya, R., Costantini, F. (2001) Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice. *J. Cell Biol.* **155**, 1055–1064.
25. Liang, H., Coles, A. H., Zhu, Z., Zayas, J., Jurecic, R., Kang, J., Jones, S. N. (2007) Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J. Exp. Med.* **204**, 3077–3084.
26. Yu, Q., Sen, J. M. (2007)  $\beta$ -Catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment. *J. Immunol.* **178**, 5028–5034.
27. Yu, Q., Xu, M., Sen, J. M. (2007)  $\beta$ -Catenin expression enhances IL-7 receptor signaling in thymocytes during positive selection. *J. Immunol.* **179**, 126–131.
28. Staal, F. J., Weerkamp, F., Baert, M. R., van den Burg, C. M., van Noort, M., de Haas, E. F., van Dongen, J. J. (2004) Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J. Immunol.* **172**, 1099–1108.
29. Weerkamp, F., Pike-Overzet, K., Staal, F. J. (2006) T-sing progenitors to commit. *Trends Immunol.* **27**, 125–131.
30. Ciofani, M., Zuniga-Pflucker, J. C. (2007) The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 463–493.
31. Spits, H. (2002) Development of  $\alpha\beta$  T cells in the human thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 760–772.
32. Blom, B., Spits, H. (2006) Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 287–320.
33. Gutierrez-Frias, C., Sacedon, R., Hernandez-Lopez, C., Cejalvo, T., Crompton, T., Zapata, A. G., Varas, A., Vicente, A. (2004) Sonic hedgehog regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34+ precursor cells. *J. Immunol.* **173**, 5046–5053.
34. Hernandez-Lopez, C., Varas, A., Sacedon, R., Jimenez, E., Munoz, J. J., Zapata, A. G., Vicente, A. (2002) Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* **99**, 546–554.
35. Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., Uittenbogaart, C. H. (2000) Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into pre-dendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J. Exp. Med.* **192**, 1775–1784.
36. McKenna, H. J. (2001) Role of hematopoietic growth factors/Flt3 ligand in expansion and regulation of dendritic cells. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 149–154.
37. Laouar, Y., Welte, T., Fu, X. Y., Flavell, R. A. (2003) STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* **19**, 903–912.
38. Zhang, S., Fukuda, S., Lee, Y., Hangoc, G., Cooper, S., Spolski, R., Leonard, W. J., Broxmeyer, H. E. (2000) Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J. Exp. Med.* **192**, 719–728.
39. Chung, K. Y., Morrone, G., Schuringa, J. J., Wong, B., Dorn, D. C., Moore, M. A. (2005) Enforced expression of an Flt3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis. *Blood* **105**, 77–84.
40. Anderson, M. K. (2006) At the crossroads: diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators. *Immunol. Rev.* **209**, 191–211.
41. Hao, Q. L., George, A. A., Zhu, J., Barsky, L., Zielinska, E., Wang, X., Price, M., Ge, S., Crooks, G. M. (2008) Human intrathymic lineage commitment is marked by differential CD7 expression: identification of CD7-lympho-myeloid thymic progenitors. *Blood* **111**, 1318–1326.
42. Garcia-Peydro, M., de Yébenes, V. G., Toribio, M. L. (2006) Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J. Immunol.* **177**, 3711–3720.
43. Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2003) Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1949–1956.
44. Yamane, T., Kunisada, T., Tsukamoto, H., Yamazaki, H., Niwa, H., Takada, S., Hayashi, S. I. (2001) Wnt signaling regulates hemopoiesis through stromal cells. *J. Immunol.* **167**, 765–772.
45. Xu, Y., Banerjee, D., Huelsken, J., Birchmeier, W., Sen, J. M. (2003) Deletion of  $\beta$ -catenin impairs T cell development. *Nat. Immunol.* **4**, 1177–1182.
46. Koch, U., Wilson, A., Cobas, M., Kemler, R., MacDonald, H. R., Radtke, F. (2008) Simultaneous loss of  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. *Blood* **111**, 160–164.
47. Jeannot, G., Scheller, M., Scarpellino, L., Duboux, S., Gardiol, N., Back, J., Kuttler, F., Malanchi, I., Birchmeier, W., Leutz, A., Huelsken, J., Held, W. (2008) Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of  $\beta$ -catenin and  $\gamma$ -catenin. *Blood* **111**, 142–149.
48. Zuklys, S., Gill, J., Keller, M. P., Hauri-Hohl, M., Zhanybekova, S., Balciunaitė, G., Na, K. J., Jeker, L. T., Hafen, K., Tsukamoto, N., Amagai, T., Taketo, M. M., Krenger, W., Hollander, G. A. (2009) Stabilized  $\beta$ -catenin in thymic epithelial cells blocks thymus development and function. *J. Immunol.* **182**, 2997–3007.
49. Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates III, J. R., Nusse, R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448–452.
50. Malhotra, S., Baba, Y., Garrett, K. P., Staal, F. J., Gerstein, R., Kincade, P. W. (2008) Contrasting responses of lymphoid progenitors to canonical and noncanonical Wnt signals. *J. Immunol.* **181**, 3955–3964.
51. Heemskerk, M. H., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A. P., Bakker, A. Q., Weijer, K., Res, P. C., Spits, H. (1997) Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *J. Exp. Med.* **186**, 1597–1602.
52. Duncan, A. W., Rattis, F. M., DiMascio, L. N., Congdon, K. L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J. M., Willert, K., Gaiano, N., Reya, T. (2005) Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* **6**, 314–322.
53. Aoyama, K., Delaney, C., Varnum-Finney, B., Kohn, A. D., Moon, R. T., Bernstein, I. D. (2007) The interaction of the Wnt and Notch pathways modulates natural killer versus T cell differentiation. *Stem Cells* **25**, 2488–2497.
54. Katoh, M., Katoh, M. (2006) Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 681–685.
55. Delaney, C., Varnum-Finney, B., Aoyama, K., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D. (2005) Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood* **106**, 2693–2699.
56. Dontje, W., Schotte, R., Cupedo, T., Nagasawa, M., Scheeren, F., Gimeno, R., Spits, H., Blom, B. (2006)  $\delta$ -Like1-induced Notch1 signaling regulates the human plasmacytoid dendritic cell versus T-cell lineage decision through control of GATA-3 and Spi-B. *Blood* **107**, 2446–2452.
57. Olivier, A., Lauret, E., Gonin, P., Galy, A. (2006) The Notch ligand Delta-1 is a hematopoietic development cofactor for plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **107**, 2694–2701.

KEY WORDS:  
Wnt • NK cells • DC • ID3 • Hes-1 • Flt3L

# Expression of BMPRIA on human thymic NK cell precursors: role of BMP signaling in intrathymic NK cell development

Laura Hidalgo,<sup>1</sup> Víctor G. Martínez,<sup>1</sup> Jaris Valencia,<sup>1</sup> Carmen Hernández-López,<sup>1</sup> Miriam N. Vázquez,<sup>1</sup> José R. Nuñez,<sup>2</sup> Agustín G. Zapata,<sup>3</sup> Rosa Sacedón,<sup>1</sup> \*Alberto Varas,<sup>1</sup> and \*Angeles Vicente<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; and <sup>2</sup>Transplant Coordination Unit, Hospital Clínico San Carlos, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; and <sup>3</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

**The bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway regulates survival, proliferation, and differentiation of several cell types in multiple tissues, including the thymus. Previous reports have shown that BMP signaling negatively regulates T-cell development. Here, we study the subpopulation of early human intrathymic progenitors expressing the type IA BMP receptor (BMPRIA) and provide evidence that CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup>BMPRIA<sup>+</sup> precursor cells mostly express surface cell markers and transcription factors typi-**

**cally associated with NK cell lineage. These CD34<sup>+</sup> cells mostly differentiate into functional CD56<sup>+</sup> natural killer (NK) cells when they are cocultured with thymic stromal cells in chimeric human-mouse fetal thymic organ cultures and also in the presence of SCF and IL-15. Moreover, autocrine BMP signaling can promote the differentiation of thymic NK cells by regulating the expression of key transcription factors required for NK cell lineage (eg, Id3 and Nfil3) as well as one of the components of IL-15 recep-**

**tor, CD122. Subsequently, the resulting population of IL-15-responsive NK cell precursors can be expanded by IL-15, whose action is mediated by BMP signaling during the last steps of thymic NK cell differentiation. Our results strongly suggest that BMPRIA expression identifies human thymic NK cell precursors and that BMP signaling is relevant for NK cell differentiation in the human thymus. (*Blood*. 2012;119(8):1861-1871)**

## Introduction

Natural killer (NK) cells are CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> large granular lymphocytes that function within the innate immune system to provide protection against infection and cancer, and they also can produce cytokines and chemokines to influence the adaptive immune response.<sup>1</sup> NK cells develop from CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells, and it is generally accepted that bone marrow is the main site of NK cell development in adult humans.<sup>1,2</sup> However, several reports have shown that hematopoietic precursors and developing NK cells also can be found in human adult intestine,<sup>3</sup> uterus,<sup>4,5</sup> liver,<sup>6</sup> and secondary lymphoid tissues, such as lymph nodes and tonsils.<sup>7</sup> The thymus also is considered a site of NK cell development because mature NK cells and multipotent as well as bipotent T/NK and NK/dendritic cell (DC) precursors can be isolated from human postnatal thymus, but a complete pathway of NK cell differentiation at this site has not been defined in humans.<sup>8-11</sup> By contrast, it has been recently demonstrated in mice the existence of a thymic pathway of NK cell development characterized by expression of CD127 and GATA-3.<sup>12</sup> Thymic NK cell development also has been reported to rely on the expression of members of the inhibitor of differentiation/DNA binding (Id) protein family, such as Id2 and Id3, the down-regulation of Notch signaling and the balance between Nfil3/E4bp4 and Bcl11b transcription factors.<sup>13-16</sup>

The bone morphogenetic protein (BMP) family includes secreted signaling proteins that bind to a heteromeric receptor complex commonly constituted by the following type I and type II serine-threonine kinase receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/

ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRII)/ALK-6, type I Activin receptor (ActRIA)/ALK-2, and type II BMP receptor (BMPRII).<sup>17-19</sup> On BMP binding, type II receptors phosphorylate type I receptors that then activate the BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads) by phosphorylation. Subsequently, BR-Smads bind to the common partner Smad4, and the complex translocates into the nucleus where it regulates the transcription of BMP target genes, including Id proteins and Runx transcription factors.<sup>18,20,21</sup>

It is now known that BMPs are involved in the development of virtually all organs and the maintenance and renewal of several adult tissues, such as the hematopoietic and lymphoid tissues.<sup>22-26</sup> In the thymus, both cortical and medullary epithelial cells express BMP receptors and produce BMP2 and BMP4 ligands.<sup>27-29</sup> Thymocyte precursors also produce BMP4 and express the type I and type II BMP receptors as well as the BR-Smads required to initiate the intracellular signaling.<sup>27,28,30</sup> The stimulation of BMP signaling pathway by treatment with BMP4 of fetal thymic organ cultures (FTOCs) enhances cell survival; inhibits thymocyte expansion; and, importantly, prevents differentiation along the T-cell lineage.<sup>27-31</sup> On the contrary, the neutralization of the action of endogenously produced BMPs by treatment with different BMP inhibitors enhances thymocyte proliferation and promotes the differentiation of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes, suggesting that BMP signaling acts as a negative regulator of T-cell development.<sup>26,28,31</sup>

Here, we show that the subpopulation of early human intrathymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> progenitor cells expressing BMPRIA contains a

Submitted July 29, 2011; accepted December 16, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 30, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-07-370650.

The online version of the article contains a data supplement.

\*A.Varas and A.Vicente contributed equally to this work.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

## ORIGINAL ARTICLE

# The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation

Víctor G Martínez<sup>1</sup>, Carmen Hernández-López<sup>1</sup>, Jaris Valencia<sup>1</sup>, Laura Hidalgo<sup>1</sup>, Ana Entrena<sup>1</sup>, Agustín G Zapata<sup>2</sup>, Angeles Vicente<sup>1</sup>, Rosa Sacedón<sup>1,3</sup> and Alberto Varas<sup>1,3</sup>

Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily, are multifunctional polypeptides regulating a broad spectrum of functions in embryonic and adult tissues. Recent reports have demonstrated that BMPs regulate the survival, proliferation and differentiation of several cell types in the immune system. In this study, we investigate the effects of BMP signaling activation on the capacity of human dendritic cells (DCs) to stimulate immune responses. Human DCs express type I and type II BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, type IA activin receptor, BMPRII) and BMP signal transduction molecules (Smad1, 5, and 8, as well as Smad4). On BMP stimulation, Id1–3 (inhibitor of differentiation 1–3/DNA binding) mRNA expression is upregulated and this effect can be blocked with the inhibitor dorsomorphin, showing that the canonical BMP signal transduction pathway is functionally active in DCs. BMP signaling activation promotes the phenotypic maturation of human DCs by increasing the expression of co-stimulatory molecules and also CD83, programmed cell death ligand 1 (PD-L1) and PD-L2, and stimulates cytokine secretion, mainly interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Accordingly, BMP-treated DCs exhibit an enhanced T-cell stimulatory capacity. BMP signaling also enhances the survival of human DCs increasing the Bcl-2/Bax ratio. Finally, the expression of Runx transcription factors is increased in mature DCs, and the mRNA levels of Runx1–3 are upregulated in response to BMP stimulation, indicating that Runx transcription factor family may mediate the effects of BMP signaling in human DC maturation.

*Immunology and Cell Biology* (2011) 89, 610–618; doi:10.1038/icb.2010.135; published online 23 November 2010

**Keywords:** bone morphogenetic proteins; dendritic cells; dorsomorphin; Id proteins; Runx proteins

Bone morphogenetic proteins (BMPs) constitute a large subgroup of secreted signaling proteins that belong to the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  superfamily.<sup>1</sup> BMPs are synthesized as large precursor molecules, which are proteolytically cleaved to release the mature proteins. The active forms usually consist of homodimers that can initiate signaling by binding to heteromeric complexes constituted by transmembrane receptors, termed type I and type II, exhibiting serine/threonine kinase activity. The type II BMP receptor (BMPRII) combined with one of the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6 and type IA activin receptor (ActRIA)/ALK-2, are the most common components of BMP receptors. The constitutively active type II receptors phosphorylate type I receptors on ligand binding, and the activated type I receptors subsequently phosphorylate downstream targets of at least two signaling cascades.<sup>1–3</sup> The canonical BMP signaling pathway involves the Smad protein family. Specifically, the BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads), Smad1, Smad5 and Smad8, are phosphorylated and activated by type I BMP receptors. Once phosphorylated, BR-Smads dissociate from the receptors, form complexes with Smad4, translocate into the nucleus, bind to BMP

responsive elements and function as transcriptional co-modulators to induce or repress BMP target gene expression.<sup>1,2</sup> The members of the Id (inhibitor of differentiation/DNA binding) protein family, a class of helix–loop–helix proteins, have been shown to be important targets for BMP signaling.<sup>1,4</sup> In addition to the canonical Smad-dependent signaling pathway, the activated receptor complexes may initiate a non-canonical Smad-independent pathway leading to activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK).<sup>1,3</sup>

BMPs were originally identified as growth and differentiation factors for osteogenic cells,<sup>5</sup> and are now considered as multifunctional polypeptides.<sup>6</sup> BMPs have key roles in the development of many organs and also function in adult tissues.<sup>1,3,7,8</sup> In the immune system, BMP6 inhibits the proliferation of human B cell progenitors as well as mature B cells through the Smad-dependent pathway.<sup>9,10</sup> Likewise, different members of BMP family have been demonstrated to have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in multiple myeloma cells.<sup>11,12</sup> We and others have shown that BMP2, BMP4 and BMP7 are the main ligands expressed in the human and murine thymus.<sup>13–15</sup> BMP4 enhances the survival of thymocyte precursors and inhibits their proliferation.<sup>15,16</sup> Also, BMP4 arrests early T-cell

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain and <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain  
<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr A Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid 28040, Spain.  
E-mail: avaras@bio.ucm.es

Received 25 May 2010; revised 8 October 2010; accepted 14 October 2010; published online 23 November 2010

# The CXCL12/CXCR4 Pair in Aged Human Thymus

Carmen Hernández-López<sup>a</sup> Alberto Varas<sup>b</sup> Rosa Sacedón<sup>b</sup> Victor G. Martínez<sup>b</sup>  
Laura Hidalgo<sup>b</sup> Jaris Valencia<sup>b</sup> Agustín G. Zapata<sup>c</sup> Ángeles Vicente<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Center for Cytometry and Microscopy, <sup>b</sup>Department of Cell Biology, School of Medicine, and <sup>c</sup>Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

## Key Words

Chemokines · CXCL12/CXCR4 · Human thymus · Aging · T cell maturation

## Abstract

CXCL12 is an important CXC chemokine involved in numerous biological processes. We had previously demonstrated the synergistic participation of CXCL12 and IL-7 in the control of both survival and proliferation of CD34<sup>+</sup> human thymic lymphoid progenitors. On this basis, we hypothesize a presumptive role for CXCL12 and its receptor, CXCR4, in the thymus involution. In this respect, in the current report we describe the expression of both molecules in the human thymus during aging. Our results demonstrate that, despite the profound alterations observed in the thymic epithelial microenvironment of aged thymuses, the proportions of different CD4/CD8 thymocyte subsets do not undergo significant variations. Remarkably, a strong CXCL12 expression was found in older thymuses, which appeared in the same locations as in younger thymuses: the subcapsular and medullary areas. The proportions of CXCR4<sup>+</sup> cells, most of them belonging to the CD3<sup>-</sup> compartment, showed no important variations in the older thymuses. However, within the CD34<sup>+</sup> cell population, a significant reduction in the expression of CXCR4 molecules was observed.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Chemokines are small, soluble proteins (about 10 kDa) capable to produce a chemotactic cellular response. The chemokine family, which approximately comprises 50 members and 25 receptors, has been divided into four groups based on the position of the four conserved cysteine residues in the N-terminal region. With a few exceptions, CC chemokines bind to CC receptors, whereas CXC chemokines activate CXC receptors. Chemokine receptors belong to the family of G-protein-coupled receptors that activate adenylate-cyclase, phospholipases, GTPases (Rho, Rac, Cdc42) and major kinases (MAPK, PI3K) [1].

CXCL12 is an important member of the CXC subfamily that was firstly isolated from a murine bone marrow stroma cell line and has pleiotropic effects on the lympho-hematopoietic system as well as on the nervous system. CXCL12 was initially reported as a highly effective chemoattractant for lymphocytes and monocytes but not for neutrophils. Later it was recognized for regulating mature T and B lymphocyte survival and the generation of memory T cells [2]. In addition, CXCL12 and its receptor CXCR4 are key factors to regulate homing/mobilization of hematopoietic stem cells between bone marrow and peripheral blood, a process that undergoes catecholamine-mediated circadian variations [3]. On the

other hand, CXCL12 and CXCR4 are constitutively expressed in the central nervous system and modulate neurotransmission, neurotoxicity and neuroglial interactions [1].

The involvement of CXCL12/CXCR4 in T cell differentiation is controversial. Although studies on CXCL12/CXCR4 gene disrupted mice suggested that these molecules are not required for the generation of a normal murine T cell population, other studies pointed out a role for CXCL12 in T cell differentiation. Several years ago, we demonstrated that CXCL12/CXCR4 signaling is not critical for the CD34<sup>+</sup> precursor cell recruitment to the human thymus but CXCL12 participates in the control of human lymphoid precursor cell survival and proliferation [4]. In this process, CXCL12 acts synergistically with IL-7, but not with other cytokines such as SCF (stem cell factor) or Flt3L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand), known to be important for the biology of lymphoid progenitors. IL-7 upregulates the CXCR4 expression on CD34<sup>+</sup> human lymphoid progenitors and, at the same time, stimulates the CXCL12 production by thymic epithelial cells (TEC). In turn, CXCL12 downregulates the IL-7 production by TEC.

The capacity of CXCL12 for controlling survival of thymic cells is not restricted to the thymocyte lineage. We recently demonstrated that human thymic dendritic cells (DC) express CXCR4 and produce CXCL12 that increases the survival and allostimulatory capacities of DC [5].

Based on these previous results, we hypothesize that since CXCL12 affects viability and proliferation of CD34<sup>+</sup> progenitor cells and their effects are related with IL-7/IL-7R signaling reported to be involved in thymus involution, this chemokine could be important to recover the thymus from physiological or experimentally induced conditions that course with decreased thymocyte production. Therefore, the current results are devoted to the analysis of CXCL12/CXCR4 condition in the involuted thymus that occurs during human aging.

### **Morphological Changes in the Human Thymus during Aging**

The first signs of histological involution were clearly evidenced in 15- to 20-year-old human thymuses, markedly increasing in 30- to 40-year-old samples. Thymic involution coursed with disappearance of a clear cortex-medulla demarcation, principally due to extreme reduction of the cortical area that, in some older samples, ap-

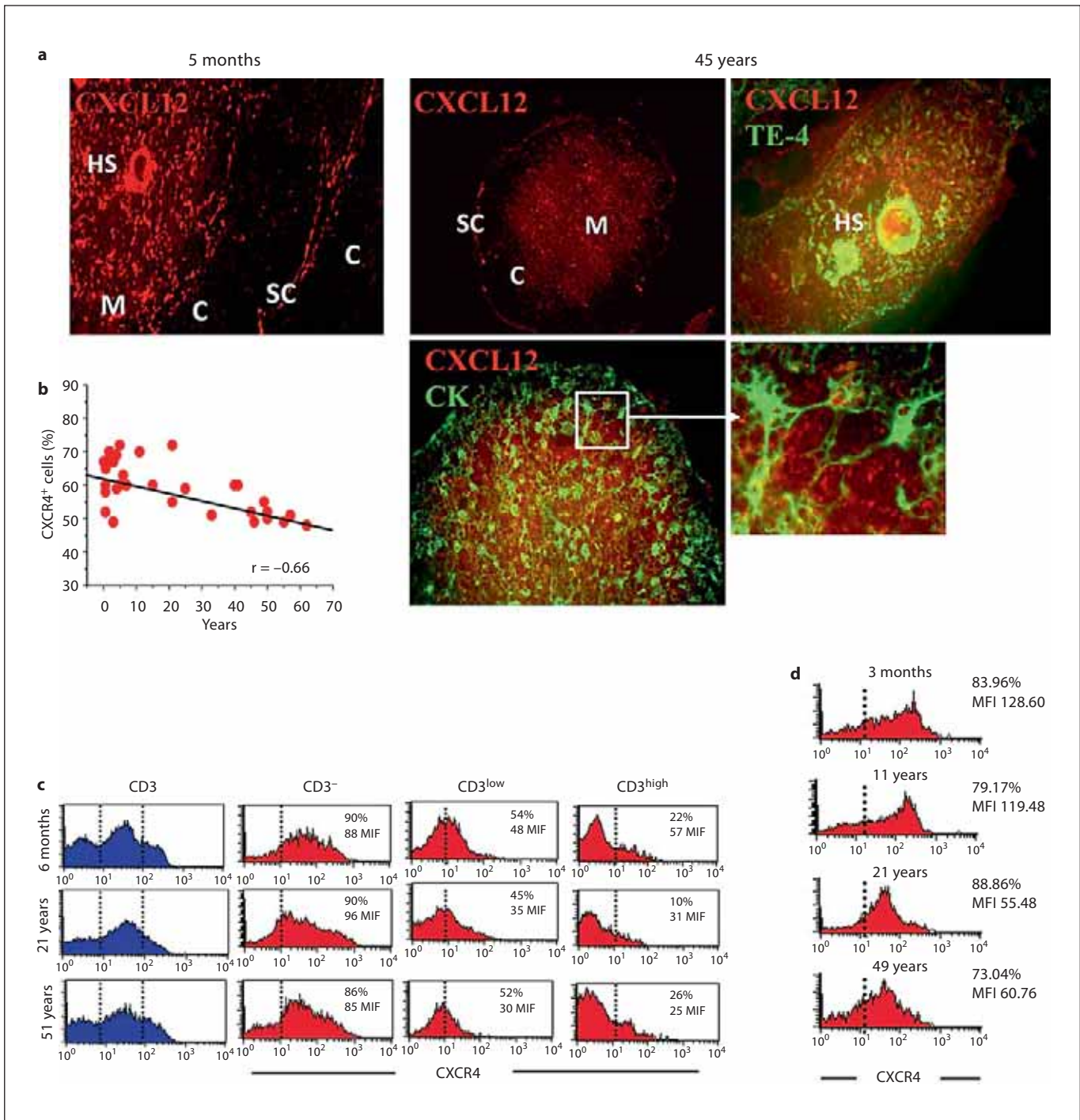
peared reduced to small groups of CD1<sup>+</sup> cells. Accordingly, the medullary area was proportionally increased but also appeared importantly altered. Other authors have described similar features in the involuted thymuses during aging, including significant reduction of the thymic surface area, decline of MHC class II and keratin expression and increased presence on certain molecules, such as Notch1 and Delta [6]. The condition of thymic medulla during aging is controversial. Some authors have described fewer changes in the medulla than in the thymic cortex of aged thymuses, but others suggest a parallel decline of both thymic compartments [6]. Retraction of epithelial cell processes in all thymic compartments also occurred in the older thymuses, a feature that has been related with the appearance of epithelial-free areas in the involuted thymuses [6].

### **Slight Changes in the Proportions of CD4/CD8 Thymocyte Subsets Occur in Aged Human Thymus**

Despite the described profound alterations occurring in the thymic epithelial microenvironment of aged thymus, no significant variations were observed in the proportions of the different thymocyte subsets defined by the expression of CD4/CD8 markers. Analysis of human samples from postnatal to 70-year-old thymuses showed just a slight increase in the older ones in the proportions of DN and SP (both CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) cells. Correspondingly, decreased proportions of DP thymocytes occurred in those older thymuses that could be related with an increased percentage of apoptotic DP cells described in those thymuses [7].

### **CXCL12 Production in Older Human Thymuses**

CXCL12 was expressed in the older thymuses in the same locations than in the younger ones [4]. By using specific markers for cortical and medullary TEC in combination with antibodies against CXCL12 we observed that CXCL12 expression occurred in the subcapsular cortical area and in both the TE-4<sup>+</sup> TEC and Hassall's bodies of thymic medulla (fig. 1a). It is important to remark that, since thymus size decreases during aging, the relative area occupied by CXCL12<sup>+</sup> cells is presumably larger in older thymuses than in younger ones.



**Fig. 1.** Expression of CXCL12 and CXCR4 in the aged human thymus. **a** Immunohistochemical detection of CXCL12 in the subcapsule (SC) and medulla (M). Note the association of CXCL12 staining with keratin (CK)-positive TEC. HS = Hassall's bodies; C = thymic cortex. **b** Proportions of total thymic CXCR4<sup>+</sup> cells in human thymuses of different ages. **c** CXCR4 expression in thymocyte subsets defined by CD3 expression. **d** Decreased numbers of CXCR4 on the surface of CD34<sup>+</sup> thymic cells during aging. MFI = Mean fluorescence intensity.

## CXCR4 Expression in the Thymus of Aged Humans

No significant variations were observed in the proportions of thymic CXCR4<sup>+</sup> cells in older thymuses. The percentage of CXCR4<sup>+</sup> cells in older thymuses was in the range described in the younger ones, although their values were in the lower level of such range in samples from individuals older than 20 years (fig. 1b).

As previously demonstrated [4] in young thymuses, most CD3<sup>-</sup> thymocytes expressed CXCR4 (around 90%) and the proportion of CXCR4<sup>+</sup> cells gradually decreased in CD3<sup>low</sup> thymocytes that largely included the DP cells (around 50%) and CD3<sup>hi</sup> SP and DP thymocytes (around 20%). However, in each of these cell subpopulations the proportion of CXCR4<sup>+</sup> cells remained basically unaltered when younger and older samples were comparatively evaluated (fig. 1c). Thus, the percentage of CXCR4-expressing CD34<sup>+</sup> cells did not change throughout the life, but from the second decade of life onward, there was a significant reduction in the mean fluorescence intensity (MFI) of CXCR4 molecule (fig. 1d). On the contrary, the CD127 (IL-7 receptor  $\alpha$  chain) expression on CD34<sup>+</sup> thymocytes did not change during aging (data not shown), although a reduced production of IL-7 with age has been reported [8].

## Conclusions

These results demonstrate no important alterations in the expression of both CXCL12 and CXCR4 in the human thymus during aging, suggesting that as in younger thymuses, these molecules could play a role in the control of thymus homeostasis during aging. On the other hand, the lower numbers of receptors expressed by CD34<sup>+</sup> lymphoid progenitors in older respect to younger thymuses together with the difficulties to establish direct correlations between the expression of CXCL12/CXCR4 and that of the IL-7/IL-7R pair, as reported in younger thymuses [4] could explain partially the low numbers known to occur in the aged thymuses, although they maintain unchanged proportions of CD4/CD8 thymocyte subsets. More functional studies are necessary, however, to confirm whether CXCL12 is involved also in aged thymuses in the control of the survival of CD34<sup>+</sup> lymphoid progenitors and other thymocyte subsets, as observed in younger ones.

## References

- 1 Li M, Ransohoff RM: Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 2008;84:116–131.
- 2 Klein RS, Rubin JB: Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol* 2004;25:306–314.
- 3 Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS: Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell* 2008;3:364–366.
- 4 Hernandez-Lopez C, Varas A, Sacedon R, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG, Vicente A: Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* 2002;99:546–554.
- 5 Hernandez-Lopez C, Valencia J, Hidalgo L, Martinez VG, Zapata AG, Sacedon R, Varas A, Vicente A: CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio. *Immunol Lett* 2008;120:72–78.
- 6 Aw D, Taylor-Brown F, Cooper K, Palmer DB: Phenotypical and morphological changes in the thymic microenvironment from ageing mice. *Biogerontology* 2009;10:311–322.
- 7 Gui J, Zhu X, Dohkan J, Cheng L, Barnes PF, Su DM: The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int Immunol* 2007;19:1201–1211.
- 8 Aspinall R, Andrew D: Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of the thymic environment. *Vaccine* 2000;18:1629–1637.

## Role of BMP signalling in peripheral CD4<sup>+</sup> T cell proliferation

Alberto Varas, Víctor G. Martínez, Carmen Hernández-López, Laura Hidalgo, Ana Entrena, Jaris Valencia, Agustín Zapata, Rosa Sacedón, Angeles Vicente

*Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid.*

### **PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN BMP EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4<sup>+</sup> PERIFÉRICAS**

*Recibido: 6 Septiembre 2009*

*Aceptado: 18 Septiembre 2009*

#### RESUMEN

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs) desempeñan un papel clave durante la embriogénesis y organogénesis de vertebrados, y también se ha descrito que llevan a cabo diversas funciones en tejidos adultos con capacidad auto-renovadora. Varios trabajos han demostrado que distintas BMPs están implicadas en el control de la proliferación de diferentes tipos celulares hematopoyéticos. En este estudio nosotros evidenciamos que las células T CD4<sup>+</sup> periféricas de ratón expresan los tres tipos de receptores tipo I de BMP (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA), y que la proporción de células T que expresan los receptores para BMPs incrementa notablemente tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD3 más anti-CD28. La vía de señalización BMP es funcional en estas células T CD4<sup>+</sup> periféricas puesto que al cultivarlas en presencia de BMP4 se incrementan los niveles de Smad1 fosforilada. Además, nuestros resultados demuestran que la adición de BMP2 y BMP4 durante la estimulación con anti-CD3/CD28 modula de manera diferencial la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup>. En conjunto, los resultados indican que la vía de señalización BMP juega un papel en las respuestas de células T.

**PALABRAS CLAVE:** Proteínas morfogenéticas óseas / Linfocitos T / Proliferación celular.

#### ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) play a key role during vertebrate embryogenesis and organogenesis, and have also been described to function in self-renewing tissues in adults. Several reports have demonstrated that distinct BMPs are involved in the control of the proliferation of different hematopoietic cell types. In this study, we provide evidence that murine peripheral CD4<sup>+</sup> T cells express the three type I BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA), and the proportions of BMP-expressing T cells increases notably after both anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulation. The BMP signalling pathway is functional in peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes since the culture of CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of BMP4 increases the levels of phosphorylated Smad1. In addition, our results show that the addition of BMP2 and BMP4 during anti-CD3/CD28 stimulation differentially modulates the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. Altogether, the data indicate a role for the signalling pathway of BMP in T cell responses.

**KEY WORDS:** Bone Morphogenetic Proteins / T cells / Cell Proliferation.

## INTRODUCTION

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted signalling proteins, which form a subgroup of the TGF- $\beta$  superfamily<sup>(1)</sup>. BMPs initiate signalling by binding to a heteromeric complex constituted by type I and type II serine/threonine kinase receptors. Type II receptors are constitutively active kinases, which transphosphorylate type I receptors upon ligand binding. Type I receptors activate intracellular substrates by phosphorylation, and thus determine the specificity of intracellular signals. The main BMP receptors are constituted by the combination of type II BMP receptor (BMPRII) and the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRII)/ALK-6, and type IA Activin receptor (ActRIA)/ALK-2<sup>(2-6)</sup>. BMP signal transduction to the nucleus is mediated by proteins of the Smad family.

Specifically, Smad1, Smad5 and Smad8 (also called BMP receptor-regulated Smads or BR-Smads) are phosphorylated and activated by type I BMP receptors. BR-Smads then form complexes with Smad-4, which translocate into the nucleus where they regulate gene expression<sup>(5-7)</sup>. In addition to this canonical Smad-dependent signalling pathway, BMP receptors may activate a non-canonical Smad-independent pathway leading to phosphorylation of p38<sup>(8)</sup>.

BMPs were originally identified by their ability to induce ectopic cartilage and bone formation<sup>(9)</sup>. Nevertheless, it has been shown that BMPs also regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis during embryogenesis<sup>(10)</sup>, and also in adult self-renewing tissues, such as the hematopoietic and immune systems. Different BMPs have been demonstrated to participate in the control of the expansion and differentiation of hematopoietic precursor cells, in synergy with several cytokines<sup>(11-13)</sup>. BMP6 inhibits the growth of human B cell progenitors and mature B lymphocytes<sup>(14,15)</sup>, and several BMPs have been shown to have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in multiple myeloma cells<sup>(16,17)</sup>. We and others have demonstrated the expression of BMP2 and BMP4 in the thymus, where these BMP ligands are involved in regulating proliferation, survival and differentiation during early T-cell development<sup>(18-20)</sup>.

The expression of BMP receptors has been reported in lymphoblastoid cell lines as well as in the Jurkat TAg cell line, whose proliferation is inhibited in the presence of BMP6<sup>(21,22)</sup>. We describe in this study the expression of functional BMP receptors in peripheral murine CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and the modulation of T cell proliferation by BMP2 and BMP4.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Young adult BALB/c mice (4-6 weeks old) were purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and maintained under pathogen-free conditions. Experiments were performed according to institutional guidelines and were approved by the Complutense University Ethical Committee for Animal Experimentation.

### Flow cytometry

The following mAb conjugated with FITC, PE, CyChrome or APC were used for flow cytometric analysis: CD4 (RM4-5), CD25 (PC61), and CD69 (H1.2F3) from BD Biosciences (San José, CA). The extracellular domains of BMP receptors were detected with PE-conjugated anti-BMPRIA (E-16) and anti-BMPRII (N-17) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), FITC-conjugated anti-BMPRIA antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN), and unconjugated anti-ActRIA antibodies (R&D Systems), followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA). Two- and three-color immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% NaN<sub>3</sub> in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4°C. For the intracellular stainings of phosphorylated Smad1, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with anti-phospho-Smad1 (Ser463/Ser465) (Santa Cruz Biotechnology) followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), all diluted in Perm/Wash buffer. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid).

### Proliferation assays

Naive CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from lymph nodes by magnetic sorting using a negative selection protocol (Miltenyi Biotech, Bergisch, Germany). Isolated CD4<sup>+</sup> T cells (1-2 x10<sup>5</sup>) were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in AIM-V serum-free medium (Invitrogen, Grand Island, NY) and stimulated with immobilized anti-CD3 (3  $\mu$ g/ml) with or without anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) mAb (BD Biosciences). In some cultures different doses (1-300 ng/ml) of rhBMP4 (R&D Systems) and rhBMP2 (RDI Research Diagnostics, Flanders, NJ) were added. At different time points, cultures

were pulsed for 12 h with 10  $\mu$ M 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at 60 °C), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at -20°C, treated with nucleases (30 min at 37°C), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at 37°C). The peroxidase reaction was developed with ABTS substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Teck Instruments, VT) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

**RESULTS**

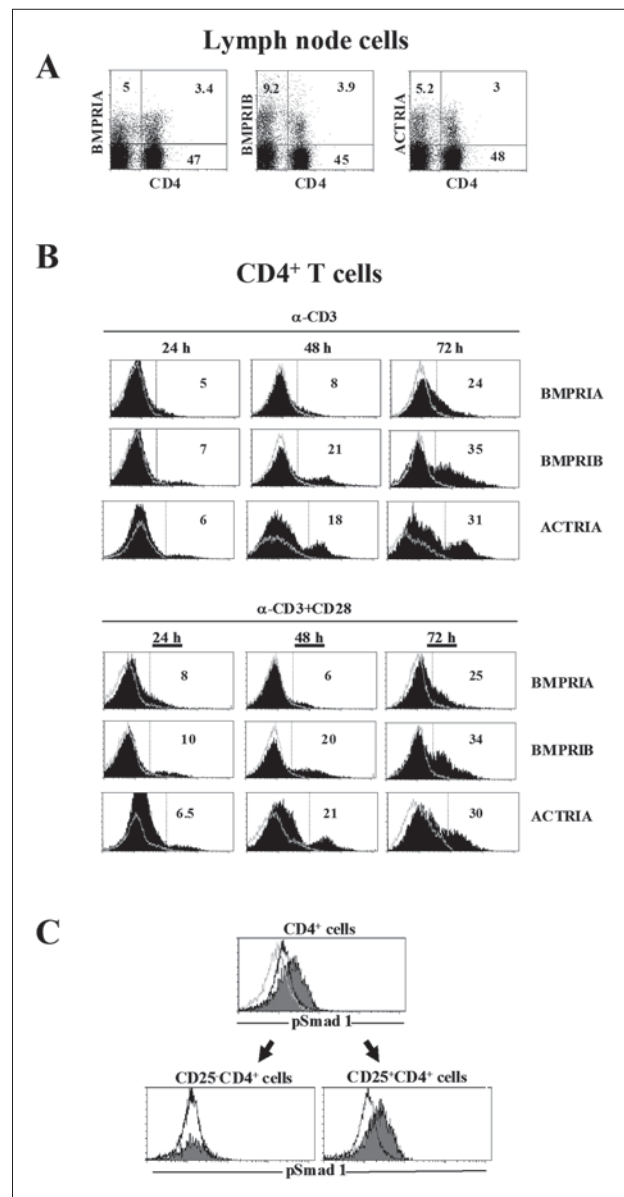
**Expression of a functional BMP signalling pathway in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells**

To determine whether murine CD4<sup>+</sup> T cells are targets for BMP, the cell surface expression of BMP receptors was analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 1A, about 6-8% of naive resting CD4<sup>+</sup> T cells expressed the three type I BMP receptors, BMPRIA, BMPRIB and ActRIA. Next, naive CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from lymph nodes, stimulated with immobilized anti-CD3 mAb with or without anti-CD28 mAb, and the BMP receptor expression was analyzed at different time points. Figure 1B shows that both anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulations induced a similar up-regulation of BMP receptor expression. Activated CD4<sup>+</sup> T cells up-regulated BMPRIA expression at 72 h, whereas BMPRIB and ActRIA expression was clearly up-regulated at 48h, increasing the proportion of positive cells at 72 h (Figure 1B). After 48 h of stimulation, BMP receptor-bearing T cells mostly express CD69, and about 60% express CD25 (data not shown).

To demonstrate that the BMP signalling pathway is active in CD4<sup>+</sup> T cells, we studied the effect of BMP addition on Smad1 phosphorylation. Smad1 is a receptor regulated Smad, directly phosphorylated and functionally activated by the BMP receptor upon ligand binding<sup>(23)</sup>. The levels of phosphorylated Smad1 notably increased when CD4<sup>+</sup> T cells were cultured in the presence of BMP4 after stimulation with anti-CD3/CD28 mAb for 48 h (Figure 1C). In addition, we showed that the expression of phosphorylated Smad1 was associated with activated CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells (Figure 1C).

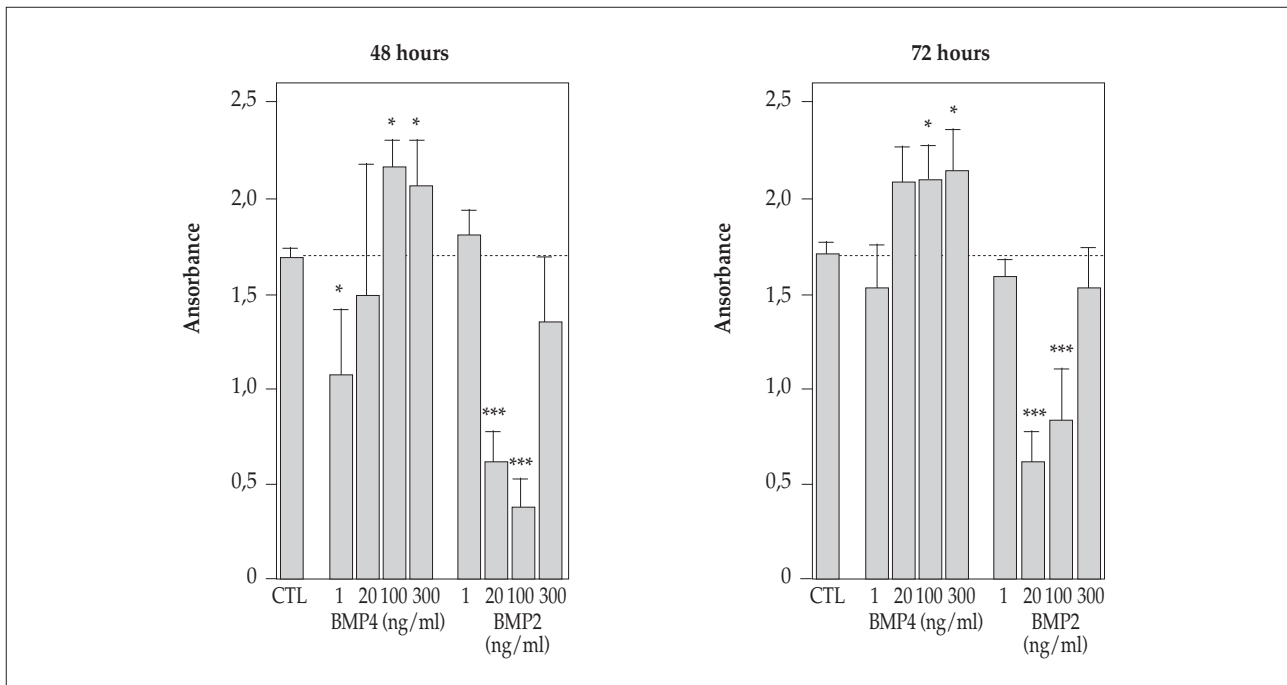
**BMP influences CD4<sup>+</sup> T cell proliferation**

Given that the BMP signalling pathway is functionally active in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells and has been also involved



**Figure 1.** Peripheral CD4<sup>+</sup> T cells express functional BMP receptors. A) Dot plots show the expression of CD4 vs type I BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB and ActRIA) on murine lymph node cells. B) CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from lymph nodes, and stimulated with anti-CD3 or anti-CD3 plus CD28 mAb for 24, 48 and 72 h. Black histograms show the expression of BMPRIA, BMPRIB and ActRIA on activated T cells. Grey lines indicate background staining. The percentages of positive cells are shown in each histogram. C) Isolated CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with CD3/CD28 mAb for 48 h and after cultured in the absence (black lines) or presence (solid histograms) of BMP4 (100 ng/ml) for two more hours. The expression of CD4, CD25 and phosphorylated Smad1 was then analyzed. Grey lines indicate background staining.

in regulating the proliferation of several cell types<sup>(11,12,14-17,22)</sup>, we investigated whether BMP signalling modulates CD4<sup>+</sup> T cell proliferation. Naive peripheral CD4<sup>+</sup> T cells were



**Figure 2.** BMP2 and BMP4 influences CD4<sup>+</sup> T cell proliferation. Isolated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were stimulated with anti-CD3/CD28 in the absence or presence of different doses (1-300 ng/ml) of BMP2 and BMP4. After 48 and 72 h, T cell proliferation was analyzed by measuring BrdU incorporation into newly synthesized DNA, as described in Materials and Methods. Bars represent the mean (± SD) of three to four independent experiments (\*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ , by t test).

isolated and stimulated with anti-CD3/CD28 mAb for 48 and 72 h in the presence of different doses of BMP4 and BMP2, which we have previously shown that play an important role in T-cell differentiation in the murine thymus<sup>(20)</sup>. Interestingly, the effects of the addition of BMP4 and BMP2 on CD4<sup>+</sup> T cell proliferation were different. Low doses of BMP4 decreased the proliferative rate of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, whereas the addition of medium to high doses of BMP4 significantly stimulated the proliferation over control values (Figure 2). On the contrary, the presence of medium BMP2 doses drastically inhibited the proliferative response of CD4<sup>+</sup> T cells, whereas the addition of low and high doses of BMP2 hardly affected T-cell proliferation (Figure 2).

**DISCUSSION**

In this study we report the expression of a functionally active BMP signalling pathway in murine peripheral CD4<sup>+</sup> T cells. Low numbers of naive CD4<sup>+</sup> T cells express BMP receptors but the proportions of BMP receptor-expressing T cells increase notably after anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulation. The increase in the levels of phosphorylated Smad1 after short-term culture with BMP4 demonstrates that the BMP pathway is functional in peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. In agreement with our results, de la Peña et

al.<sup>(21)</sup> reported the expression of functional BMP receptors in lymphoblastoid cell lines established from human peripheral blood mononuclear cells. Likewise, Sivertsen et al.<sup>(22)</sup> showed that human Jurkat TAG cells as well as human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells, mostly with a CD45RO<sup>+</sup> memory phenotype, express BMP receptors, and BMP6 stimulation of these cells led to Smad1/5/8 phosphorylation. However, the composition of the active BMP receptor complex expressed by T cells remains controversial. Our data indicate that the three type I BMP receptors are expressed similarly in both naive and activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, whereas BMPRIA is the main type I BMP receptor expressed by lymphoblastoid cell lines<sup>(21)</sup> and ActRIA is largely expressed in Jurkat TAG cells and human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells<sup>(22)</sup>. A differential BMP receptor expression in distinct T cell subpopulations and species-specific differences could account for the discrepancy between these results.

Our results indicate that the BMP signalling pathway plays a role in peripheral T lymphocytes mainly after activation via CD3/TCR, influencing, at least, T cell proliferation. Different reports have demonstrated that BMP ligands have the ability to modulate the proliferation of several hematopoietic cell types such as thymocytes<sup>(18-20)</sup>, B lymphocytes<sup>(14, 15)</sup>, hematopoietic stem cells<sup>(11-13)</sup> and Jurkat TAG cells<sup>(22)</sup>.

An interesting finding derived from this study is that BMP2 and BMP4 ligands differentially modulate T cell proliferation. BMP2 and BMP4 normally induce similar cellular responses<sup>(24, 25)</sup>, but differential effects of different doses of BMP4 compared with BMP2 have been also reported on human hematopoietic stem cells<sup>(11)</sup>. Bathia and collaborators explained those results according to the possible existence of different cell subpopulations expressing different BMP receptors and/or regulatory intracellular molecules<sup>(11)</sup>. Since both canonical (Smad mediated) and non-canonical (p38 MAPK mediated) BMP signalling pathways have been described to function in T cells<sup>(21,22)</sup>, an alternative explanation is that BMP2 and BMP4 could differentially trigger the Smad and non-Smad-dependent signalling pathways leading to distinct cell responses, as reported in other cellular systems<sup>(26,27)</sup>.

In summary, we show that the BMP pathway is functional in peripheral murine CD4<sup>+</sup> T cells. Furthermore, the expression of BMP receptors mainly in activated T cells and the BMP modulation of T cell proliferation suggest that BMP signalling is a physiological component of CD4<sup>+</sup> T cell responses.

## DISCLOSURES

The authors declare no financial conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2006-00651 (Ministerio de Educación y Ciencia), RD06/0010/0003 (Instituto de Salud Carlos III), GR74/07-910552 (Universidad Complutense / Comunidad Autónoma de Madrid), and PR34/07-15867 (Universidad Complutense / Grupo Santander).

### CORRESPONDENCIA:

Angeles Vicente, PhD  
Departamento de Biología Celular. Facultad de Medicina.  
Universidad Complutense. 28040 Madrid, Spain  
Phone: +34 91 3947166. Fax: +34 91 3941396  
E-mail: avicente@bio.ucm.es

## REFERENCIAS

1. Kingsley DM. The TGF- $\beta$  superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-146.
2. Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: A cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002;250:231-250.
3. Gazzero E, Minetti C. Potential drug targets within bone morphogenetic protein signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:325-333.
4. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9:49-61.
5. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:251-263.
6. Zwijsen A, Verschueren K, Huylebroeck D. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett* 2003;546:133-139.
7. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF- $\beta$  superfamily signalling. *Genes Cells* 2002;7:1191-1204.
8. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- $\beta$ /BMP and other pathways. *Cell Res* 2009; 19: 71-88.
9. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899.
10. Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 2004; 9: 349-358.
11. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1139-1148.
12. Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine* 2002; 17: 36-42.
13. Grassinger J, Simon M, Mueller G, Drewel D, Andreesen R, Hennemann B. Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines. *Cytokine* 2007; 40: 165-171.
14. Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, Sivertsen EA, Hystad ME, Smeland EB, et al. BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis-upregulation of Id1 and Id3. *Exp Hematol* 2006; 34:72-81.
15. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol* 2005; 6: 9.
16. Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Borset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood* 2001; 97: 516-522.
17. Ro TB, Holt RU, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, et al. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene* 2004; 23:3024-3032.
18. Cejalvo T, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Diez B, Gutierrez-Frías C, Valencia J, et al. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology* 2007; 121: 94-104.
19. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merckenschlager M. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 2002; 196: 163-171.
20. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 2002; 169: 5496-5504.

21. de la Pena LS, Billings PC, Fiori JL, Ahn J, Kaplan FS, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1168-1176.
22. Sivertsen EA, Huse K, Hystad ME, Kersten C, Smeland EB, Myklebust JH. Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2937-2948.
23. Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF- $\beta$  family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997; 11: 984-95.
24. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 366-371.
25. Yokouchi Y, Sakiyama J, Kameda T, Iba H, Suzuki A, Ueno N, et al. BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* 1996; 122: 3725-3734.
26. Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20380-20385.
27. Kendall SE, Battelli C, Irwin S, Mitchell JG, Glackin CA, Verdi JM. NRAGE mediates p38 activation and neural progenitor apoptosis via the bone morphogenetic protein signaling cascade. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 7711-7724.

# Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells

Alberto Varas,<sup>1,†,\*</sup> Rosa Sacedón,<sup>1,†</sup> Laura Hidalgo,<sup>1</sup> Víctor G. Martínez,<sup>1</sup> Jaris Valencia,<sup>1</sup> Teresa Cejalvo,<sup>2</sup> Agustín Zapata,<sup>2</sup> Carmen Hernández-López<sup>1</sup> and Angeles Vicente<sup>1</sup>

Department of Cell Biology; Faculties of <sup>1</sup>Medicine and <sup>2</sup>Biology; Complutense University; Madrid, Spain

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Key words:** human thymus, CD34<sup>+</sup> cells, bone morphogenetic proteins, Hedgehog proteins

Bone morphogenetic proteins (BMPs) play a pivotal role during vertebrate embryogenesis and organogenesis, and have also been described to function in regulating cell fate and determination in self-renewing tissues in adults. Recent results have demonstrated that the different components of the BMP2/4 signaling pathway are expressed in the human thymus. In this study, we provide evidence that BMP4 and IL-7 interplay is important in the maintenance of the human thymic progenitor population. Intrathymic CD34<sup>+</sup> cells express BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA, BMPRII), signal transduction molecules (Smad1, 5, 8 and 4), and produce BMP4. Neutralization of endogenous BMP4 by treatment with the antagonist Noggin reduces thymic precursor cell survival, and the addition of exogenous BMP4 decreases their proliferation. The treatment of chimeric human-mouse fetal thymus organ cultures with BMP4 inhibits cell expansion, arrests thymocyte differentiation, and leads to the accumulation of human CD34<sup>+</sup> precursor cells. This effect is mainly attributed to the ability of BMP4 to counteract the IL-7-induced proliferation and differentiation of CD34<sup>+</sup> cells. BMP4 downregulates in the precursor cell population the expression of CD127 and inhibits the IL-7-dependent STAT5 phosphorylation. In addition, BMP signaling is promoted by IL-7. Our results also demonstrate that in thymic progenitors BMPs act downstream of Sonic Hedgehog, previously described to function as a maintenance factor for human intrathymic CD34<sup>+</sup> precursor cells.

Do not distribute.

## Introduction

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted growth factors, which form a subgroup of the TGF $\beta$  superfamily.<sup>1</sup> More than 20 BMP family members have already been described. They have been classified into several subgroups according to their structural similarities, and also include BMP-like molecules from various species, including dpp protein from *Drosophila melanogaster*.<sup>2,3</sup> BMPs are dimeric proteins which, upon dimerization, are secreted and proteolytically cleaved. Once secreted, the BMP dimers initiate signaling by binding to a heterotetrameric complex constituted by transmembrane receptors, termed type I and type II, exhibiting serine/threonine kinase activity. The type II receptors are constitutively active kinases, which transphosphorylate type I receptors upon ligand binding. The type I receptors activate intracellular substrates by phosphorylation, and thus determine the specificity of intracellular signals. The main BMP receptors are constituted by the combination of type II BMP receptor (BMPRII) and the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6, and type IA Activin receptor (ActRIA)/ALK-2.<sup>3-7</sup> BMP signal transduction to the nucleus is mediated by Smad protein family. Specifically, Smad1, Smad5 and Smad8 (also called BMP receptor-regulated Smads or BR-Smads) are

phosphorylated and activated by type I BMP receptors. Once phosphorylated, BR-Smads bind to Smad-4 forming a heteromeric complex that translocates into the nucleus where it regulates gene expression using different mechanisms.<sup>6-8</sup>

The Hedgehog (Hh) protein family is a group of secreted intercellular signaling molecules which, in mammals, is composed by three proteins: Sonic (Shh), Indian (Ihh) and Desert Hh (Dhh), and Shh is the best studied.<sup>9,10</sup> Hh proteins undergo extensive post-translational modifications before being secreted.<sup>11,12</sup> Upon secretion, all Hh proteins share a common signaling pathway where Patched (Ptc) and Smoothened (Smo) constitute the surface receptor complex. Ptc is the ligand binder, and Smo transduces the signal into the cell. In the absence of ligand, Ptc exerts an inhibitory effect on Smo activity that is abrogated after Hh binding.<sup>9,13,14</sup> The intracellular signaling cascade initiated by Smo culminates in the activation of members of the Gli family of zinc finger transcription factors, Gli1, Gli2 and Gli3, which regulate the transcription of different target genes.<sup>15</sup>

Although BMP and Hh signaling pathways are known to play critical roles in vertebrate and invertebrate embryogenesis, determining cell fate and patterning during the development of many organs,<sup>10,16-20</sup> several studies have demonstrated that BMPs and Hh proteins also function in cell fate determination of self-renewing tissues in the adult, such as the hematopoietic

\*Correspondence to: Alberto Varas; Email: avaras@bio.ucm.es

Submitted: 08/17/09; Revised: 09/18/09; Accepted: 09/21/09

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cc/article/10149



## CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio

Carmen Hernández-López<sup>a</sup>, Jaris Valencia<sup>a</sup>, Laura Hidalgo<sup>a</sup>, Víctor G. Martínez<sup>a</sup>, Agustín G. Zapata<sup>b</sup>, Rosa Sacedón<sup>a</sup>, Alberto Varas<sup>a</sup>, Angeles Vicente<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 April 2008

Received in revised form 30 June 2008

Accepted 7 July 2008

Available online 8 August 2008

#### Keywords:

Human thymus

Thymic dendritic cells

CXCL12

Survival

### ABSTRACT

CXCL12, a member of the chemokine CXC subfamily, and its physiologic receptor CXCR4 are essential for the development of various organs during embryonic development and are also involved in the control of cell survival, proliferation and migration in adult tissues. In the human thymus, CXCL12 is produced by epithelial cells located in the subcapsular and medullary regions and CXCR4 is expressed in different thymocyte subpopulations. Several results have demonstrated that CXCL12/CXCR4 signaling participates in different intrathymic processes including the control of human precursor cell survival and proliferation, and the exit of mature thymocytes to the periphery. In this study, we show that CXCL12 is also produced by human thymic dendritic cells (DCs), most of which express CXCR4 receptor. The addition of exogenous CXCL12 significantly inhibited the serum depletion-induced apoptosis in thymic DCs, and the treatment with neutralizing antibodies against CXCL12 or CXCR4 decreased their survival. The survival-promoting effect of CXCL12 was mediated by the up-regulation of Bcl-2 protein expression and the concomitant down-regulation of Bax protein expression. The higher viability of thymic DCs also enhanced their allostimulatory capacity. Taken together, the results suggest a new function of CXCL12 in the human thymus controlling the survival and functionality of thymic DCs.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

CXCL12 (stromal cell-derived factor 1/SDF-1) is a CXC chemokine constitutively expressed by most tissues, in contrast to the majority of the other chemokines that are usually induced by pro-inflammatory cytokines [1,2]. Two isoforms, SDF-1 $\alpha$  and SDF-1 $\beta$ , are generated from the CXCL12/SDF-1 gene by alternative splicing, and SDF-1 $\alpha$  represents the predominant isoform [3,4]. CXCL12 was initially identified as a pre-B cell growth factor and was later demonstrated to play critical roles in organogenesis as well as homing/mobilization, survival, proliferation and activation of different types of normal and malignant cells [1,5–10]. CXCR4, the receptor for CXCL12, is a G-protein-coupled 7-transmembrane receptor that also functions as a coreceptor for the entry of T-tropic strains of human immunodeficiency virus 1 into CD4<sup>+</sup> cells [11–13].

Accumulating evidence suggests that CXCL12 and its receptor CXCR4 may play an important role in intrathymic T-cell differentiation in both humans and mice: CXCL12 mRNA and protein

are abundantly expressed in fetal and adult thymus [14–19]; CXCR4 is highly expressed on intrathymic progenitor cells and to a lesser extent on immature CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> and CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes [15–17,20]; CXCL12 functions as a chemotactic factor to direct the migration of early thymic precursor cells from the cortico-medullary border to the cortex [16], as well as the movement of immature CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> through the thymic cortical area [21], and also functions as a fugetactic factor to regulate mature thymocyte emigration to periphery [22,23]; CXCL12/CXCR4 signaling is required for the survival of human CD34<sup>+</sup> intrathymic precursor cells and partially mediates the effects of IL-7 on the expansion and differentiation of human early thymocytes [15]; the blockade of CXCL12/CXCR4 signaling pathway, using different mutant and chimeric mice, results in reduced numbers of thymocytes and an arrest in thymocyte maturation [16,24–26]. However, nothing has been reported about a possible role for CXCL12/CXCR4 signaling in the function of thymic dendritic cells (DCs). Thymic DCs are professional antigen-presenting cells that are mostly located in the cortico-medullary border and the medulla [27,28]. Their main function is to present self-antigens and induce negative selection of potential auto-reactive T-cell clones [29,30]. We report in this study that thymic DCs express CXCR4 and produce CXCL12. In addition,

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 3947166; fax: +34 91 3941396.  
E-mail address: [avicente@bio.ucm.es](mailto:avicente@bio.ucm.es) (A. Vicente).

we show that CXCL12 promotes the survival of thymic DCs regulating the balance between the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the pro-apoptotic protein Bax.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of human thymic dendritic cells

Thymus samples from 1-month to 5-year-old children ( $n=20$ ) undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Monte Príncipe and 12 de Octubre Hospitals (Madrid, Spain). Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. Thymic cell suspensions were firstly depleted of CD2<sup>+</sup> thymocytes by using the sheep red blood cell rosetting technique [31], and the recovered cells were then depleted of T, B, myeloid and NK cells and thymic progenitors by treatment with anti-CD3, anti-CD7, anti-CD19, anti-CD14, anti-CD34 and anti-CD56 (all from BD Biosciences, San Jose, CA) bound to sheep anti-mouse Ig-coated magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway), as previously described [32]. The purity of the recovered DCs was greater than 95%.

### 2.2. Histology and immunofluorescence

As previously described [15,33], thymic cryosections (7  $\mu$ m thick) were air-dried for 2 h at room temperature and fixed in acetone for 10 min, and cytopsin preparations of thymic DCs were fixed in acetone for 5 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nonspecific binding of antibodies was blocked by incubation with diluted donkey serum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and avidin-biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections and cytopsin were then sequentially incubated with anti-human CXCL12/SDF-1 $\alpha$  antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN), biotinylated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), Texas red-conjugated streptavidin (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom), and anti-human medullary/subcapsular thymic epithelial cells (TE-4; kindly provided by Dr. B.F. Haynes, Duke University, Medical Center, Durham, NC) in the case of thymic cryosections, or anti-human HLA-DR (BD Biosciences, San José, CA) in the case of cytopsin, followed by FITC-conjugated human adsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Slides were mounted in Vectashield (Vector Laboratories) and then examined using a Zeiss Axioplan-2 microscope (Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid).

### 2.3. RT-PCR analysis

RNA isolation was performed using a Strataprep Total RNA Miniprep Kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA), including a Dnase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized with Superscript II RT polymerase (Invitrogen, Grand Island, NY), according to the instructions of the commercial supplier, and then used as target in the PCR amplifications. Amplifications were performed using specific primer sets previously described [34]. All PCR reactions were performed on a Mastercycler gradient machine (Eppendorf, Hamburg, Germany) using AmpliTaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) under the following conditions: 3 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , 40 cycles of 45 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 s of each particular T annealing and, 45 s at  $72^{\circ}\text{C}$ , followed by 10 min at  $72^{\circ}\text{C}$ .

PCR products were resolved on a 2% agarose gel and the measured sizes were as expected.

### 2.4. Culture of isolated thymic DCs

Purified thymic DCs ( $1 \times 10^5$ ) were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in 0.2 ml of AIMV serum-free medium (Invitrogen) in the absence or presence of recombinant human CXCL12/SDF-1 $\alpha$  (2.5–10 ng/ml), neutralizing mouse anti-human CXCR4 antibodies (10  $\mu$ g/ml), neutralizing goat anti-human CXCL12/SDF-1 $\alpha$  antibodies (10  $\mu$ g/ml) or recombinant human CD40 ligand (CD40L; 10  $\mu$ g/ml) (all from R&D Systems, Minneapolis, MN). After different periods of culture at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5% CO<sub>2</sub>-in-air incubator, cells were harvested, counted and processed for viability analysis and flow cytometry stainings.

### 2.5. Flow cytometry

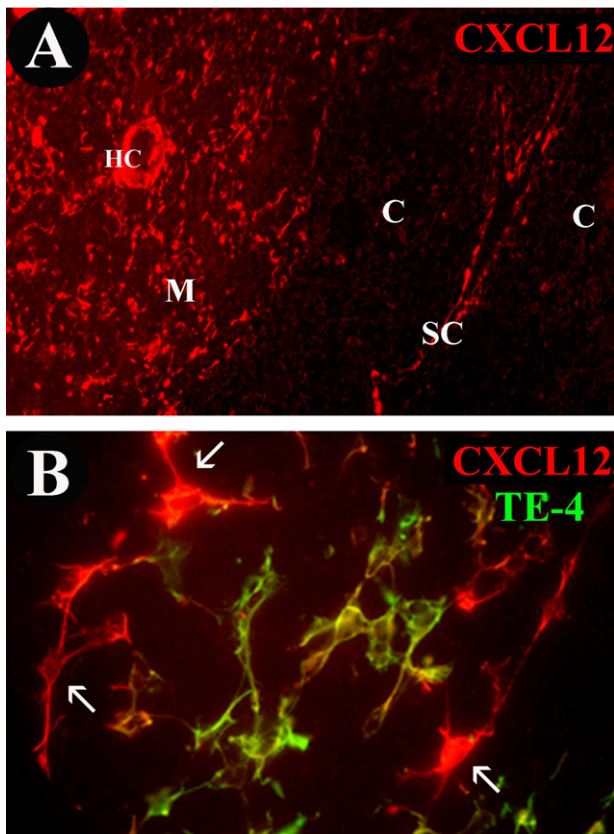
The following mAbs conjugated with FITC, PE or Cychrome were used for flow cytometric analysis: CD40 (5C3), CD80 (BB1), CD86 (2331), CD184/CXCR4 (12G5), HLA-DR (G46-6) from BD Biosciences, and CD54 (15.2) from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). Immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% NaN<sub>3</sub> in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated Abs for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . For the intracellular stainings, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with PE-conjugated anti-human Bcl-2 mAb (BD Biosciences), anti-human Bcl-X<sub>L</sub> mAb, anti-human Bim mAb (both from Chemicon, Temecula, CA), anti-human Bax Ab (BD Biosciences) and anti-human CXCL12/SDF-1 $\alpha$  Ab (R&D Systems), followed by FITC- or PE-conjugated multi-adsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-mouse, anti-rat, anti-rabbit or anti-goat IgG, respectively, all of them diluted in Perm/Wash buffer. Cell viability was estimated by propidium iodide staining. Analyses were conducted in a FAC-SCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and a three laser BD LSR flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid.

### 2.6. MLR assays

Thymic DCs were used at different numbers as stimulators for resting allogeneic T cells ( $2 \times 10^5$ ) isolated from peripheral blood. The cultures were performed in 96-well flat-bottom culture plates, using 0.2 ml of AIMV supplemented with 2% human serum. After 3 days at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5% CO<sub>2</sub>-in-air incubator, the cultures were pulsed for 12 h with 10  $\mu$ M 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at  $60^{\circ}\text{C}$ ), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ , treated with nucleases (30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ ), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at  $37^{\circ}\text{C}$ ). The peroxidase reaction was developed with ABTS substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Teck Instruments, VT) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

### 2.7. DC-T cell conjugates

Control and CXCL12 pre-treated DCs were cultured for 24 and 48 h in the absence of rhCXCL12, stained with CFSE (Invitrogen) and mixed with allogeneic T cells previously stained with PKH26



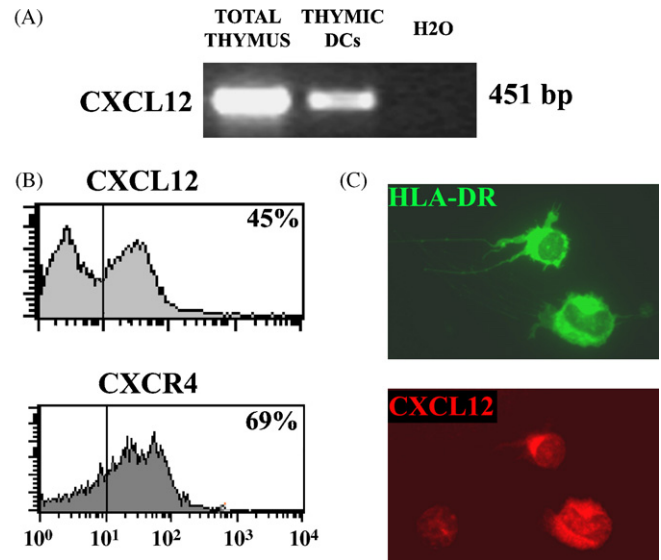
**Fig. 1.** Expression of CXCL12 in the human thymus. Frozen sections of human thymus were double stained with anti-CXCL12/SDF-1 $\alpha$  antibodies (red fluorescence; A and B) in combination with anti-TE-4 antibodies recognizing human subcapsular and medullary thymic epithelial cells (green fluorescence; B). In the thymic medulla, CXCL12 expression is detected in both TE-4-positive epithelial cells (yellow cells) and TE-4-negative cells (arrows) exhibiting a dendritic cell morphology (B). Original magnifications: 50 $\times$  (A); 250 $\times$  (B); SC, subcapsular area; C: cortex; M: medulla; HC: Hassall's corpuscle. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Sigma España, Spain). DCs and T cells were mixed at a ratio of 1:5, spun at 500 rpm for 5 min to facilitate cell–cell contact and cultured for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Next, weak conjugates were dislodged by mild vortexing and the proportion of DC/T cell conjugates was analyzed by flow cytometry.

### 3. Results

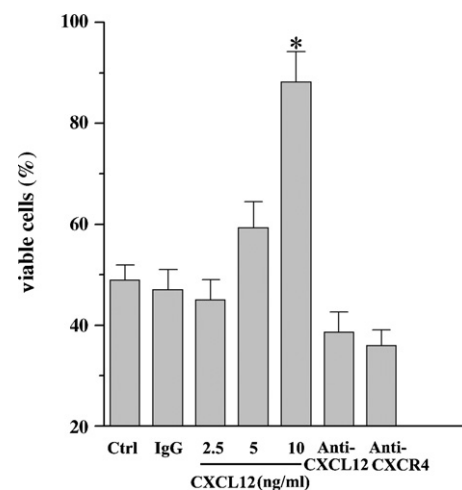
#### 3.1. Expression of CXCL12 and its receptor CXCR4 in human thymic dendritic cells

Previous reports have described in the human thymus that CXCL12 expression is restricted to the thymic subcapsula and medulla [15,19], and that CXCL12-expressing cells mainly correspond to thymic epithelial cells, as demonstrated by double immunofluorescence stainings using specific cell markers for subcapsular and medullary thymic epithelial cells [15]. However, in the thymic medullary regions it also appeared scattered cells with a dendritic morphology that strongly expressed CXCL12 protein and did not react with anti-thymic epithelial cell mAbs (Fig. 1). To investigate whether those cells corresponded to thymic DCs expressing CXCL12, this thymic cell population was isolated and the expression of RNAs encoding CXCL12 was assessed by RT-PCR. As shown in Fig. 2A, specific transcripts for CXCL12 were detected in purified thymic DCs confirming their capacity to produce CXCL12. The intra-

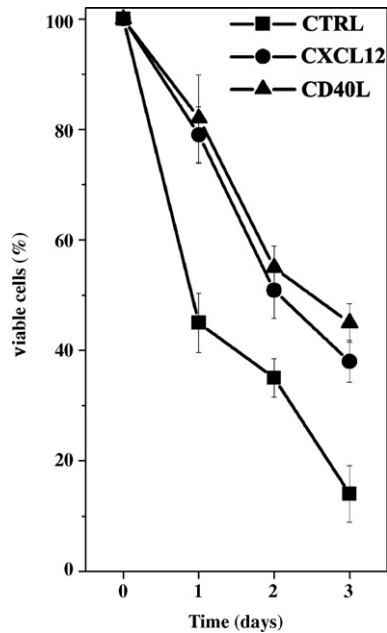


**Fig. 2.** Expression of CXCL12 and CXCR4 in human thymic dendritic cells. (A) RT-PCR analysis of the expression of CXCL12 on total thymus and purified thymic DCs. Band size is indicated. H<sub>2</sub>O served as negative control. (B) Histograms show the cytoplasmic expression of CXCL12 protein as well as the surface expression of CXCR4 on thymic DCs. The percentages of positive cells are indicated in each histogram. Background fluorescence values were set by the use of isotype-matched irrelevant mAbs. (C) Human thymic DCs were isolated, cytospun onto slides and stained with anti-CXCL12/SDF-1 $\alpha$  and HLA-DR antibodies. Micrographs demonstrate the cytoplasmic expression of CXCL12 in thymic DCs identified by their morphology and HLA-DR expression. Results shown are representative of three to nine independent experiments.

cytoplasmic expression of CXCL12 protein was further analyzed by flow cytometry (Fig. 2B) and by immunofluorescence on cytospin preparations (Fig. 2C), demonstrating in both cases that the proportion of SDF-producing DCs was about 30–50%. The cell surface expression of CXCR4 was also analyzed by flow cytometry, showing that a high proportion ( $\approx$ 70%) of thymic DCs expressed the receptor for CXCL12 (Fig. 2B).



**Fig. 3.** CXCL12 enhances the survival of human thymic dendritic cells. Determination of thymic DC viability after culture in serum-free medium alone or supplemented with either different doses of rhCXCL12 or neutralizing antibodies against CXCR4 receptor (10  $\mu$ g/ml) or CXCL12 protein (10  $\mu$ g/ml). Number of input cells, 10<sup>5</sup>. After 24 h, cells were recovered, counted, and stained with propidium iodide. Data represent the mean ( $\pm$ S.D.) of five independent experiments, including three cultures per point (\* $P$   $\leq$  0.05, by *t*-test).



**Fig. 4.** CXCL12 is a dendritic cell survival factor. Thymic DCs were cultured for several days in the absence or presence of rhCXCL12 (10 ng/ml) or CD40L (10  $\mu$ g/ml). Cell viability was assessed daily by propidium iodide staining. Data represent the mean ( $\pm$ S.D.) of three to five independent experiments.

### 3.2. CXCL12 enhances the survival of human thymic DCs

To determine the functional relevance of CXCL12/CXCR4 signaling in human thymic DCs, experiments were performed in which thymic DCs were cultured for 24 h in serum-free medium with different doses of rhCXCL12, and cellular viability was evaluated. The presence of rhCXCL12 increased the recovery of thymic DCs in a dose-responsive manner, with a maximal effect at a concentration of 10 ng/ml which induced a twofold increase in viability (Fig. 3). On the contrary, the addition of neutralizing antibodies against human CXCR4 receptor or human CXCL12 protein induced moderate decrease in the cell recovery from DC cultures (Fig. 3).

Thymic DCs were next cultured in the presence of the highest dose of rhCXCL12 for several periods of time. Fig. 4 shows that the viability of thymic DCs cultured in the absence of rhCXCL12 diminished progressively, and by day 3 a high proportion of DCs were dead. In contrast, the addition of rhCXCL12 significantly inhibited DC apoptosis during the whole culture period, being the highest effect detected on day 3 (Fig. 4). Remarkably, the SDF-dependent anti-apoptotic effects were comparable to those induced by the lig-

ation of CD40, a potent survival stimulus for dendritic cells (Fig. 4) [35–39].

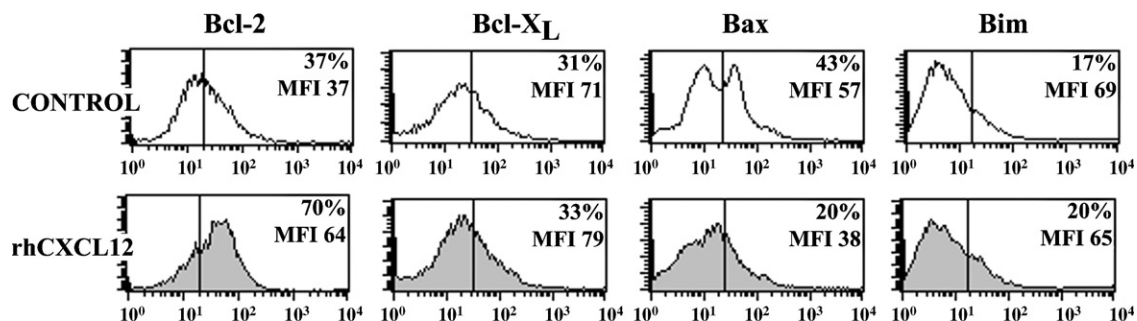
To gain insight into the molecular mechanisms by which CXCL12 inhibits the serum depletion-induced apoptosis in thymic DCs, we examined in untreated and SDF-treated thymic DC suspensions the expression of different Bcl-2 family proteins, known to control DC survival [36,40–42]. The presence of rhCXCL12 induced a significant up-regulation of Bcl-2 expression (1.5–2.5 times in percentage of positive cells and 1.5–2 times in mean fluorescence intensity) and, concomitantly, an important down-regulation of Bax expression (2–2.5 times in percentage of positive cells and 1.5–2 times in mean fluorescence intensity) (Fig. 5). Therefore, the treatment of thymic DCs with rhCXCL12 induced a drastic increase in the Bcl-2/Bax ratio (untreated DCs: 0.8; SDF-treated DCs: 3.5), which correlated with the higher survival of thymic DCs in SDF-treated cultures. On the contrary, the expression of the anti-apoptotic Bcl-X<sub>L</sub> protein and the pro-apoptotic Bim protein was not significantly affected by the presence of rhCXCL12 (Fig. 5).

### 3.3. CXCL12 effects on thymic DC allostimulatory capacity

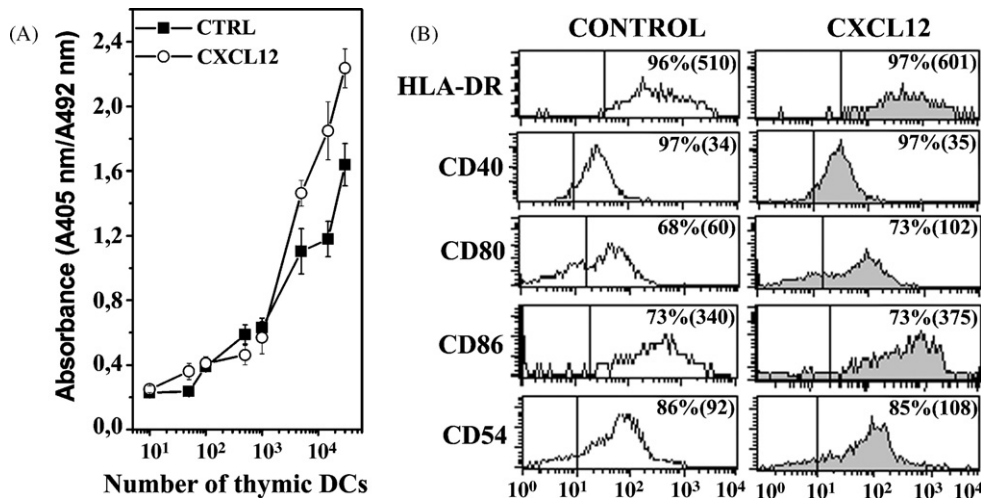
To evaluate the capacity of CXCL12 to affect DC functionality, thymic DCs were pre-treated overnight with rhCXCL12 and equivalent numbers of viable CXCL12-treated or untreated thymic DCs were used in a MLR. Exogenous rhCXCL12 was not added during the whole culture period to avoid the effects on responding T cells. The MLR assays revealed that CXCL12-treated DCs were able to induce a higher T cell proliferative response (Fig. 6A). The ability of control and CXCL12-treated DCs to form tight conjugates with T cells was also examined, and we showed that the proportion of conjugated DCs was higher at 48 h (C:  $6.2 \pm 1.3$ ; CXCL12:  $13.1 \pm 1.1$ ), but not at 24 h (C:  $19 \pm 2.9$ ; CXCL12:  $23 \pm 5.6$ ) after CXCL12 pre-treatment. The analysis of the surface expression of HLA-DR, CD40, CD80, CD86 and CD54 molecules showed that there were no significant differences between untreated and CXCL12-treated thymic DCs were compared (Fig. 6B). No changes were detected in the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-12 (data not shown). Then, these results indicate that the higher capacity of CXCL12-treated DCs to stimulate T cell proliferation would be attributed to the survival-promoting effect of CXCL12.

## 4. Discussion

In the present study we show that in the human thymus, apart from the subcapsular and medullary thymic epithelial cells, thymic DCs are also able to produce CXCL12. In addition, thymic DCs mostly express its receptor CXCR4, indicating that CXCL12/CXCR4 axis may influence DC functionality. In agreement with our findings, Schmitt



**Fig. 5.** CXCL12 regulates the Bcl-2/Bax ratio in human thymic dendritic cells. The expression of Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bax and Bim proteins was determined by flow cytometry in untreated and SDF-treated thymic DCs. Dashed lines represent background staining. The percentages of positive cells and the mean fluorescence intensities are indicated in the histograms. Data are representative results from three independent experiments.



**Fig. 6.** T-cell stimulatory function of SDF-treated thymic dendritic cells. (A) Thymic DCs were cultured overnight in the presence or absence of rhCXCL12 and used at different numbers as stimulators for resting allogeneic T cells. After 3 days, the cultures were pulsed with BrdU for 12 h. A specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Results are the means ( $\pm$ S.D.) of the pooled data from three experiments, each with three cultures per point. (B) The expression of HLA-DR, CD40, CD80, CD86 and CD54 was analyzed by flow cytometry in untreated and SDF-treated thymic DCs used for the MLR assays. The percentages of positive cells (and mean fluorescence intensities) are indicated in the histograms.

et al. [43] have recently reported that CXCR4-tropic viruses efficiently replicated in thymic DCs. Likewise, CXCR4 expression have been described in several types of peripheral DCs [19,44–47] and Pablos et al. [48] have demonstrated that skin and lymph node DCs produce CXCL12. Nevertheless, the fact that not all thymic DCs produce CXCL12 or express CXCR4 suggest that thymic DC subpopulations may exhibit a selective usage of chemokine receptors and a differential migration behaviour, correlated to their different functions, as has been reported for myeloid and plasmacytoid dendritic cells from human peripheral blood [49–51].

In the human thymus, CXCL12 seems to exert pleiotropic effects regulating critical processes in thymocyte development such as the survival and the IL-7-mediated expansion and subsequent differentiation of CD34<sup>+</sup> precursor cells [15], the elimination of apoptotic thymocytes [19], the movement of some populations of immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes in the cortex [21], and the emigration of mature thymocytes from the thymus as a result of a fugetactic migratory response to CXCL12 [22]. Our current data show a new function for CXCL12 controlling the survival of human thymic DCs, since the addition of rhCXCL12 notably protects them from serum depletion-induced apoptosis, whereas the blockade of CXCL12/CXCR4 signaling reduces DC viability. CXCL12 has also been reported to function as a survival factor for different cell types, including T cells [52,53], neurons [54,55], osteoclasts [56], hematopoietic progenitor cells [8,15,57,58], embryonic stem cells [59] and tumour cells [6,60,61]. We also investigated the effects of CXCL12 on the expression of those Bcl-2 family proteins reported to regulate DC survival [36,40–42]. Our results indicate that the survival-promoting effects of CXCL12 involves an increase in the Bcl-2/Bax ratio due to both the up-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 protein and the down-regulation of pro-apoptotic Bax protein. In accordance with these results, the modulation of the CXCL12/CXCR4 signaling has been demonstrated to be able to induce changes in the Bcl-2/Bax ratio in human T cell lines, intrathymic CD34<sup>+</sup> cells and granulosa cells [15,62,63]. In contrast, the expression of Bcl-X<sub>L</sub> and Bim proteins in human thymic DCs does not appear to be altered by the treatment with CXCL12. Wright et al. [56] described, however, an up-regulation of Bcl-X<sub>L</sub> and a down-regulation of Bim after the addition of CXCL12 to cultures of human osteoclasts, a cell type that has been described to express

little or no Bcl-2, and whose Bax levels are not affected by CXCL12 [56].

The factors that control the survival, and consequently the longevity of thymic DCs remain poorly analyzed, and to our knowledge only Vasilijic et al. [64] have shown that GM-CSF, presumably produced by thymic epithelial cells [65], could function as an anti-apoptotic factor for DCs in rat thymus. We extend this finding and demonstrate that CXCL12 regulates human thymic DC viability by an autocrine/paracrine mechanism, and could therefore function as a survival factor during the lifespan of thymic DCs. The increase in DC viability involves an enhancement of their functionality, as demonstrated by others [39,42] and also by our results with MLR and DC/T cell conjugation assays. Then, in the future, it would be interesting to investigate whether CXCL12 may also enhance the survival of peripheral DCs, what could increase their efficacy when used as vaccines.

Besides these physiological functions, the secretion of CXCL12 by thymic DCs could also play a role in pathological situations, such as HIV infection. In these circumstances, CXCL12 production would represent an antiviral mechanism that could increase the survival of thymic DCs, which are directly infected due to the expression of CD4 and CXCR4 and die after infection [43], and/or could delay the propagation of X4 HIV strains by inducing the down-regulation of CXCR4 in neighboring thymocytes [48].

#### Acknowledgements

This work was supported by grants BFU2006-00651 and BFU2007-65520 from the Ministerio de Educación y Ciencia, RD06/0010/0003 from the Instituto de Salud Carlos III, and GR74/07-910552 from the Universidad Complutense y Comunidad Autónoma de Madrid. We thank the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital Madrid-Montepríncipe and Hospital 12 de Octubre for the thymus samples.

#### References

- [1] Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol* 1998;10:179–85.

- [2] Ponomarev T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000;106:1331–9.
- [3] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995;28:495–500.
- [4] Tashiro K, Tada H, Heikler R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993;261:600–3.
- [5] Arya M, Ahmed H, Silhi N, Williamson M, Patel HR. Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12–CXCR4 (chemokine ligand–receptor) interaction in cancer cell migration. *Tumour Biol* 2007;28:123–31.
- [6] Juarez J, Bendall L. SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis. *Histol Histopathol* 2004;19:299–309.
- [7] Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1–CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005;23:879–94.
- [8] Lataillade JJ, Domenech J, Le Bousse-Kerdiles MC. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:177–88.
- [9] Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4<sup>+</sup> T cell activation. *J Immunol* 2000;164:5010–4.
- [10] Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1–CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006;20:1915–24.
- [11] Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829–33.
- [12] Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872–7.
- [13] Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833–5.
- [14] Bleul CC, Boehm T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol* 2000;30:3371–9.
- [15] Hernandez-Lopez C, Varas A, Sacedon R, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* 2002;99:546–54.
- [16] Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 2003;171:4521–7.
- [17] Suzuki G, Sawa H, Kobayashi Y, Nakata Y, Nakagawa K, Uzawa A, et al. Peritussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J Immunol* 1999;162:5981–5.
- [18] Wilkinson B, Owen JJ, Jenkinson EJ. Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. *J Immunol* 1999;162:3873–81.
- [19] Zaitseva M, Kawamura T, Loomis R, Goldstein H, Blauvelt A, Golding H. Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J Immunol* 2002;168:2609–17.
- [20] Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, Tiffany HL, Farber JM, Peden KW, et al. CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 1998;161:3103–13.
- [21] Swainson L, Kinet S, Manel N, Battini JL, Sitbon M, Taylor N. Glucose transporter 1 expression identifies a population of cycling CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> human thymocytes with high CXCR4-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:12867–72.
- [22] Poznansky MC, Olszak IT, Evans RH, Wang Z, Foxall RB, Olson DP, et al. Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest* 2002;109:1101–10.
- [23] Vianello F, Kraft P, Mok YT, Hart WK, White N, Poznansky MC. A CXCR4-dependent chemorepellent signal contributes to the emigration of mature single-positive CD4 cells from the fetal thymus. *J Immunol* 2005;175:5115–25.
- [24] Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, et al. A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* 2003;170:4649–55.
- [25] Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, Kawamoto H, Tachibana K, Iizasa H, et al. A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5663–7.
- [26] Onai N, Zhang Y, Yoneyama H, Kitamura T, Ishikawa S, Matsushima K. Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intrakinase. *Blood* 2000;96:2074–80.
- [27] Ardavin C. Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 1997;18:350–61.
- [28] Evans VA, Cameron PU, Lewin SR. Human thymic dendritic cells: regulators of T cell development in health and HIV-1 infection. *Clin Immunol* 2008;126:1–12.
- [29] Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev* 2006;209:290–6.
- [30] Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17:304–12.
- [31] Beaulieu S, Landry D, Bergeron D, Cohen EA, Montplaisir S. An improved method for purifying human thymic dendritic cells. *J Immunol Methods* 1995;180:225–36.
- [32] Varas A, Jimenez E, Sacedon R, Rodriguez-Mahou M, Maroto E, Zapata AG, et al. Analysis of the human neonatal thymus: evidence for a transient thymic involution. *J Immunol* 2000;164:6260–7.
- [33] Sacedon R, Vicente A, Varas A, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG. Glucocorticoid-mediated regulation of thymic dendritic cell function. *Int Immunol* 1999;11:1217–24.
- [34] Aiuti A, Turchetto L, Cota M, Cipponi A, Brambilla A, Arcelloni C, et al. Human CD34<sup>+</sup> cells express CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor-1. Implications for infection by T-cell tropic human immunodeficiency virus. *Blood* 1999;94:62–73.
- [35] Bjorck P, Banchereau J, Flores-Romo L. CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int Immunol* 1997;9:365–72.
- [36] Hou WS, Van Parijs L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* 2004;5:583–9.
- [37] Miga AJ, Masters SR, Durell BG, Gonzalez M, Jenkins MK, Maliszewski C, et al. Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154–CD40 interactions. *Eur J Immunol* 2001;31:959–65.
- [38] Pirtskhalaishvili G, Shurin GV, Esche C, Cai Q, Salup RR, Bykovskaia SN, et al. Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins. *Br J Cancer* 2000;83:506–13.
- [39] Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997;186:2075–80.
- [40] Chen M, Huang L, Shabier Z, Wang J. Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Mol Immunol* 2007;44:2558–65.
- [41] Hon H, Rucker III EB, Hennighausen L, Jacob J. Bcl-x<sub>L</sub> is critical for dendritic cell survival in vivo. *J Immunol* 2004;173:4425–32.
- [42] Nopora A, Brocker T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol* 2002;169:3006–14.
- [43] Schmitt N, Nugeyre MT, Scott-Algara D, Cumont MC, Barre-Sinoussi F, Pancino G, et al. Differential susceptibility of human thymic dendritic cell subsets to X4 and R5 HIV-1 infection. *Aids* 2006;20:533–42.
- [44] Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *Aids* 2005;19:261–71.
- [45] Ayehunie S, Garcia-Zepeda EA, Hoxie JA, Horuk R, Kupper TS, Luster AD, et al. Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine coreceptors. *Blood* 1997;90:1379–86.
- [46] Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, et al. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 1997;159:1993–2000.
- [47] Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997;3:1369–75.
- [48] Pablos JL, Amara A, Boulouc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, et al. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol* 1999;155:1577–86.
- [49] Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:1862–6.
- [50] Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002;63:1164–71.
- [51] Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere F, et al. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* 2003;198:823–30.
- [52] Pajusto M, Ihalainen N, Pelkonen J, Tarckanen J, Mattila PS. Human in vivo-activated CD45RO<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are susceptible to spontaneous apoptosis that can be inhibited by the chemokine CXCL12 and IL-2, -6, -7, and -15. *Eur J Immunol* 2004;34:2771–80.
- [53] Suzuki Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4<sup>+</sup> T cells to stromal cell-derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2001;167:3064–73.
- [54] Chalasani SH, Baribaud F, Coughlan CM, Sunshine MJ, Lee VM, Doms RW, et al. The chemokine stromal cell-derived factor-1 promotes the survival of embryonic retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2003;23:4601–12.
- [55] Khan MZ, Brandimarti R, Musser BJ, Resue DM, Fatatis A, Meucci O. The chemokine receptor CXCR4 regulates cell-cycle proteins in neurons. *J Neurovirol* 2003;9:300–14.
- [56] Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone* 2005;36:840–53.
- [57] Broxmeyer HE, Kohli L, Kim CH, Lee Y, Mantel C, Cooper S, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and Gai proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol* 2003;73:630–8.

- [58] Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, You M, Kohli L, Mantel C, et al. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood* 2002;99:4307–17.
- [59] Guo Y, Hangoc G, Bian H, Pelus LM, Broxmeyer HE. SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23:1324–32.
- [60] Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006;107:1761–7.
- [61] Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2006;60:273–6.
- [62] Kryczek I, Frydman N, Gaudin F, Krzysiek R, Fanchin R, Emilie D, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to T lymphocyte recruitment in human pre-ovulatory follicles and coordinates with lymphocytes to increase granulosa cell survival and embryo quality. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:270–83.
- [63] Yang WB, Kong PY, Chang C, Wei L, Zeng DF, Peng XG, et al. Effects of RNA interference inhibiting SDF-1 expression in bone marrow stromal cells on the proliferation and apoptosis of co-cultured Jurkat cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2005;26:421–4.
- [64] Vasilijic S, Colic M, Vucevic D. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is an anti-apoptotic cytokine for thymic dendritic cells and a significant modulator of their accessory function. *Immunol Lett* 2003;86:99–112.
- [65] Le PT, Lazorick S, Whichard LP, Yang YC, Clark SC, Haynes BF, et al. Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *J Immunol* 1990;145:3310–5.

# Survival and function of human thymic dendritic cells are dependent on autocrine Hedgehog signaling

Alberto Varas,<sup>\*1</sup> Carmen Hernández-López,<sup>\*</sup> Jaris Valencia,<sup>\*</sup> Silvia Mattavelli,<sup>†</sup> Victor G. Martínez,<sup>\*</sup> Laura Hidalgo,<sup>\*</sup> Cruz Gutiérrez-Frías,<sup>\*</sup> Agustín G. Zapata,<sup>†</sup> Rosa Sacedón,<sup>\*</sup> and Angeles Vicente<sup>\*</sup>

Department of Cell Biology, Faculties of <sup>\*</sup>Medicine and <sup>†</sup>Biology, Complutense University, Madrid, Spain

**Abstract:** The Hedgehog (Hh) family of signaling molecules functions in the development of numerous tissues during embryogenesis and has also been involved in adult self-renewing tissues. Recent results have demonstrated that the different components of the Hh signaling pathway are expressed in the human thymus. In this study, we investigate whether thymic dendritic cells (DCs) are cell targets for Hh signaling. Both components of the Hh receptor, Patched and Smoothed, as well as other Hh-binding proteins with modulating functions, are expressed by human thymic DCs. The expression of Gli1, Gli2, and Gli3 transcription factors suggests that the Hh signaling pathway is active in thymic DCs, and approximately one-half of thymic DCs produces Sonic Hh (Shh). The culture of thymic DCs with Shh protects them from apoptosis [similarly to CD40 ligand (CD40L)], and these antiapoptotic effects are related to an up-regulation of Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> protein expression. The addition of the Hh pathway inhibitor, cyclopamine, decreases DC viability and impairs their allostimulatory function *in vitro*. In addition, the blockade of the Hh signaling pathway by cyclopamine treatment abrogates the up-regulation of HLA-DR, CD86, CD80, and CD83 expression induced by CD40L on thymic DCs. Finally, we also show that after activation with CD40L thymic DCs down-regulate the expression of Hh receptor components as well as Shh production. Taken together, these results suggest that the survival and function of thymic DCs are regulated by an autocrine Hh signaling. *J. Leukoc. Biol.* 83: 1476–1483; 2008.

**Key Words:** thymus · cyclopamine · Patched · Smoothed

## INTRODUCTION

The Hedgehog (Hh) signaling pathway plays critical roles in vertebrate and invertebrate embryogenesis, determining cell fate and patterning during the development of many organs, as well as regulating survival and proliferation of a number of different cell types [1, 2]. The importance of this pathway is emphasized by the fact that mutations leading to an aberrant

Hh pathway can result in severe developmental defects and cancers in humans [3–6]. In mammals, three proteins have been described to compose the Hh family: Sonic (Shh), Indian (Ihh), and Desert Hh (Dhh), and Shh is the best studied [1, 7]. Hh proteins undergo extensive post-translational modifications before being secreted, and Hh signaling is initiated by binding of Hh proteins to the 12-span transmembrane receptor Patched (Ptc), which in the absence of ligand, represses signaling by inhibiting the seven-transmembrane protein Smoothed (Smo). Upon ligand binding, the repressive activity of Ptc is abrogated, allowing Smo to transduce the signal toward the nucleus by a complex mechanism [7–9]. At the end of the Hh signaling pathway are the members of the Gli family of transcription factors, Gli1, Gli2, and Gli3. The specific functions of the Gli proteins are still poorly understood, although all of the activities demonstrated for Gli1 are positive, whereas Gli2 and Gli3 mainly function as positive and negative transcriptional regulators, respectively [10–12].

The different components of the Hh signaling pathway have been described to be expressed in the thymus [13–15] and to play an important role regulating the proliferation and differentiation of thymocyte precursors [13, 14, 16–19]. In humans, the three mammalian Hh proteins are produced by thymic epithelial cells. Shh-producing epithelial cells are restricted to the thymic subcapsula and medulla, and Ihh- and Dhh-expressing epithelial cells appear distributed throughout the thymic parenchyma. The requisite Hh receptors, Ptc and Smo, are expressed mainly by immature thymocytes and also by thymic epithelial cells located in the cortex and medulla. The Gli transcription factors are differentially expressed by the different thymic cell subpopulations [15]. The culture of CD34<sup>+</sup> T cell precursors in the presence of recombinant Shh protein induces their survival. It also inhibits their IL-7-mediated proliferation and differentiation by down-regulating CD127/IL-7R expression and inhibiting IL-7-dependent STAT5 phosphorylation, indicating that Shh contributes to maintain the intrathymic progenitor cell population [17]. How-

<sup>1</sup> Correspondence: Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Avda. Complutense s/n, Ciudad Universitaria, Complutense University, 28040 Madrid, Spain. E-mail: avaras@bio.ucm.es

Received November 26, 2007; revised January 24, 2008; accepted February 13, 2008.

doi: 10.1189/jlb.1107792

ever, nothing has been described about the expression of the Hh signaling pathway components on human thymic dendritic cells (DCs) or about a possible role for Hh signaling in thymic DC function. Thymic DCs are specialized APCs, mainly localized in the medulla and corticomedullary junction, which are able to present self-antigens to developing thymocytes and play a pivotal role in thymocyte-negative selection and central tolerance induction [20–22]. We report in this study that thymic DCs express all the molecular machinery required to respond to Hh proteins. In addition, we show that thymic DCs produce Shh, which functions autocrinally to regulate their survival and functionality.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of human thymic DCs

Human thymus samples from patients, aged 1 month to 5 years, undergoing corrective cardiac surgery, were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of La Zarzuela and Madrid-Monte Príncipe Hospitals (Madrid, Spain). Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. Thymic cell suspensions were first depleted of CD2<sup>+</sup> thymocytes by using the SRBC rosetting technique, and the recovered cells were then depleted of T, B, myeloid, and NK cells and thymic progenitors by treatment with anti-CD3, anti-CD7, anti-CD19, anti-CD14, anti-CD34, and anti-CD56 (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA) bound to sheep anti-mouse, Ig-coated magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway), as described previously [23]. The purity of the recovered DCs was greater than 95%, and the cell surface phenotype of the resulting DC population is shown in **Figure 1A**.

### RT-PCR analysis

RNA isolation was performed using a Strataprep Total RNA Miniprep kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA), including a DNase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized with Superscript II RT polymerase (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), according to the instructions of the commercial supplier, and then used as a target in the PCR amplifications, which were performed using specific primer sets described previously [15, 24]. All PCR reactions were performed on a Mastercycler gradient machine (Eppendorf, Hamburg, Germany) using AmpliTaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following conditions: 3 min at 94°C, 40 cycles of 45 s at 94°C, 45 s of each particular T annealing, and 45 s at 72°C, followed by 10 min at 72°C. PCR products were resolved on a 2% agarose gel, and the measured sizes were as expected.

### Culture of isolated thymic DCs

Purified thymic DCs ( $1 \times 10^5$ ) were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in 0.2 ml AIM V serum-free medium (Invitrogen) in the absence or presence of cyclopamine (5  $\mu$ M), a cell-permeable inhibitor of the Hh signaling pathway (generously gifted by Dr. William Gaffield, Western Regional Research Center, Albany, CA, USA); tomatidine (5  $\mu$ M), a steroidal alkaloid that structurally resembles cyclopamine but lacks the capacity to inhibit Hh signaling (Calbiochem, Nottingham, UK); recombinant human CD40 ligand (CD40L; 10  $\mu$ g/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); and modified recombinant human Shh (kindly provided by Curis, Cambridge, MA, USA; endotoxin level: <1 EU/mg Shh protein). This Shh protein was octylated for high activity. In vitro modification of N-Shh (aa 25–199), with a lipophilic group on the N-terminal cysteine, significantly increases the specific activity (>30-fold) of *Escherichia coli*-derived N-Shh as measured by activation of Hh signal transduction in cultured cells. Octyl N-Shh is a hydrophobically modified version of the Shh signaling protein generated by coupling N-octyl-maleimide to the N-terminal cysteine of bacterially derived N-Shh. This modification

represents a simple and efficient way to generate high, specific-activity Shh protein from bacterially expressed Shh [25]. After different periods of culture at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-in-air incubator, cells were harvested, counted, and processed for viability analysis and flow cytometry stainings.

### MLR assays

Thymic DCs were used at different numbers (10 cells to  $15 \times 10^3$  cells) as stimulators for resting allogeneic T cells ( $2 \times 10^5$ ) isolated from peripheral blood. The cultures were performed in 96-well flat-bottom culture plates, using 0.2 ml AIM V supplemented with 2% human serum. After 3 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-in-air incubator, the cultures were pulsed for 12 h with 10  $\mu$ M BrdU. A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at 60°C), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at –20°C, treated with nucleases (30 min at 37°C), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at 37°C). The peroxidase reaction was developed with 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline sulphonic acid) substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

### Flow cytometry

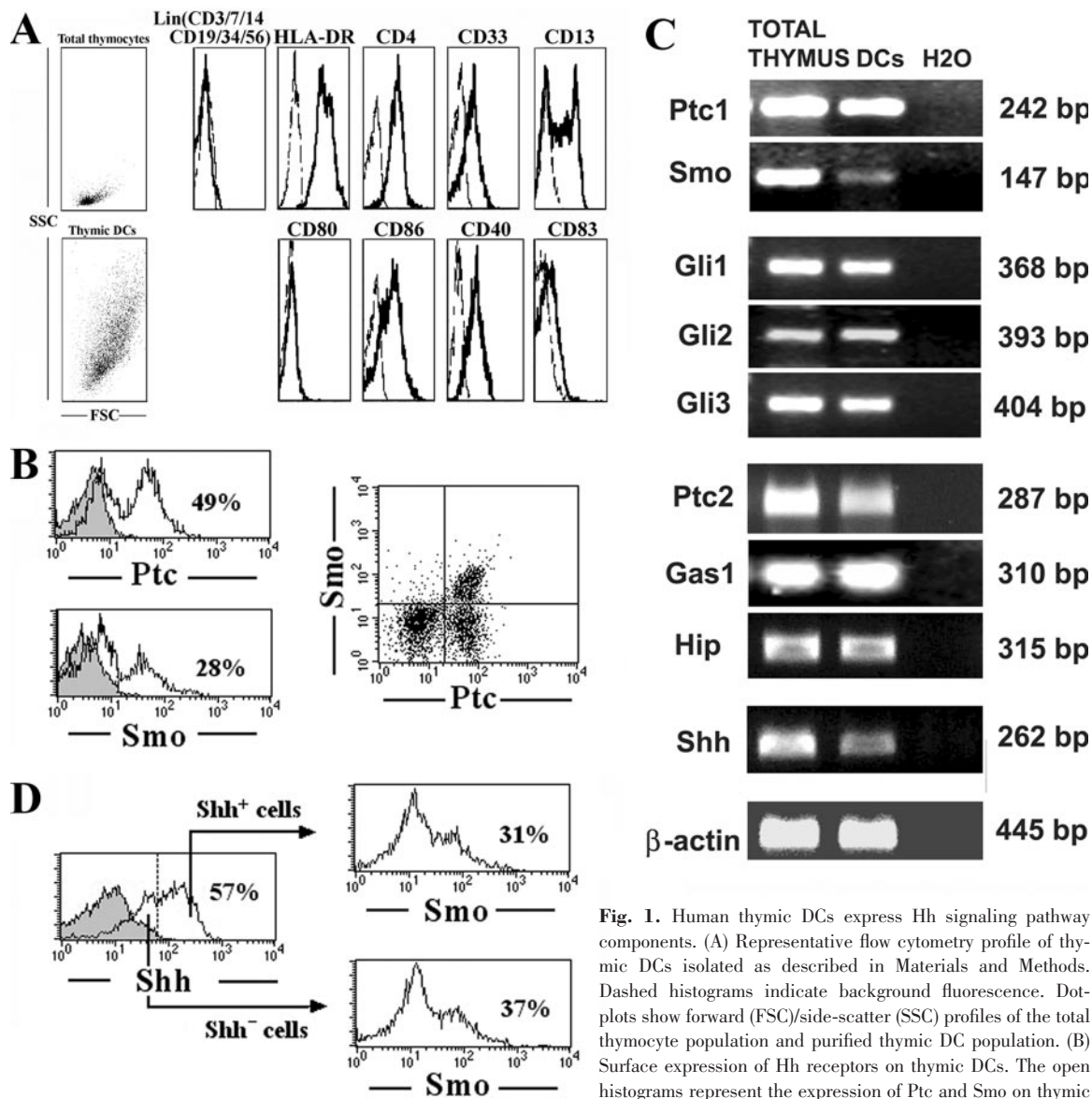
The following mAb conjugated with FITC, PE, or Cychrome were used for flow cytometric analysis: CD4 (SK3), CD13 (R3-242), CD33 (WM53), CD40 (5C3), CD80 (BB1), CD86 (2331), and HLA-DR (G46-6) from BD Biosciences and CD83 (HB15A) from Coulter-Immunotech (Beckman-Coulter, Marseille, France). The extracellular domains of Hh receptors were detected with PE-conjugated anti-Smo (N-19) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-Ptc1 antibodies (Abcam, Cambridge, UK) followed by FITC- or PE-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA, USA). Two- and three-color immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% NaN<sub>3</sub> in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4°C. For the intracellular stainings and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with PE-conjugated anti-human Bcl-2 mAb (BD Biosciences), anti-human Bcl-X<sub>L</sub> and anti-human Bim mAb (both from Chemicon, Temecula, CA, USA), and anti-Shh C-terminal peptide antibody (R&D Systems), followed by FITC- or PE-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-mouse, anti-rat, or anti-goat IgG, respectively—all of them diluted in Perm/Wash buffer. Cell viability was estimated by propidium iodide staining. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and a three-laser BD LSR flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University (Madrid, Spain).

## RESULTS

### Expression of Hh signaling pathway components in human thymic DCs

To determine whether DCs are targets for Hh proteins in the human thymus, the cell surface expression of the Hh receptor components was analyzed by flow cytometry. As shown in **Figure 1B**, 40–60% of thymic DCs were positive for Ptc, the Hh-binding subunit, and 20–45% expressed Smo, the signaling component of the Hh receptor. Moreover, the majority of Smo-expressing DCs coexpressed Ptc in the plasma membrane (**Fig. 1B**).

The expression of Hh receptors was confirmed by RT-PCR, as Ptc- and Smo-encoding RNAs were detected in purified thymic DCs (**Fig. 1C**). Likewise, the thymic DC population



**Fig. 1.** Human thymic DCs express Hh signaling pathway components. (A) Representative flow cytometry profile of thymic DCs isolated as described in Materials and Methods. Dashed histograms indicate background fluorescence. Dot-plots show forward (FSC)/side-scatter (SSC) profiles of the total thymocyte population and purified thymic DC population. (B) Surface expression of Hh receptors on thymic DCs. The open histograms represent the expression of Ptc and Smo on thymic DCs, and solid histograms indicate background staining. The

percentages of positive cells are shown in each histogram. Dot-plot shows the correlated expression of Ptc and Smo on isolated thymic DCs. (C) RT-PCR analysis of the expression of different components of the Hh signaling pathway on total thymus and isolated thymic DCs. Band sizes are indicated. H<sub>2</sub>O served as negative control. Gas1, Growth arrest-specific gene 1; Hip, Hh-interacting protein. (D) Open histograms show the cytoplasmic expression of the Shh protein on thymic DCs, as well as the surface expression of the Smo receptor of Shh-producing and nonproducing thymic DCs. The percentages of positive cells are indicated in each histogram. Data are representative of five to nine independent experiments.

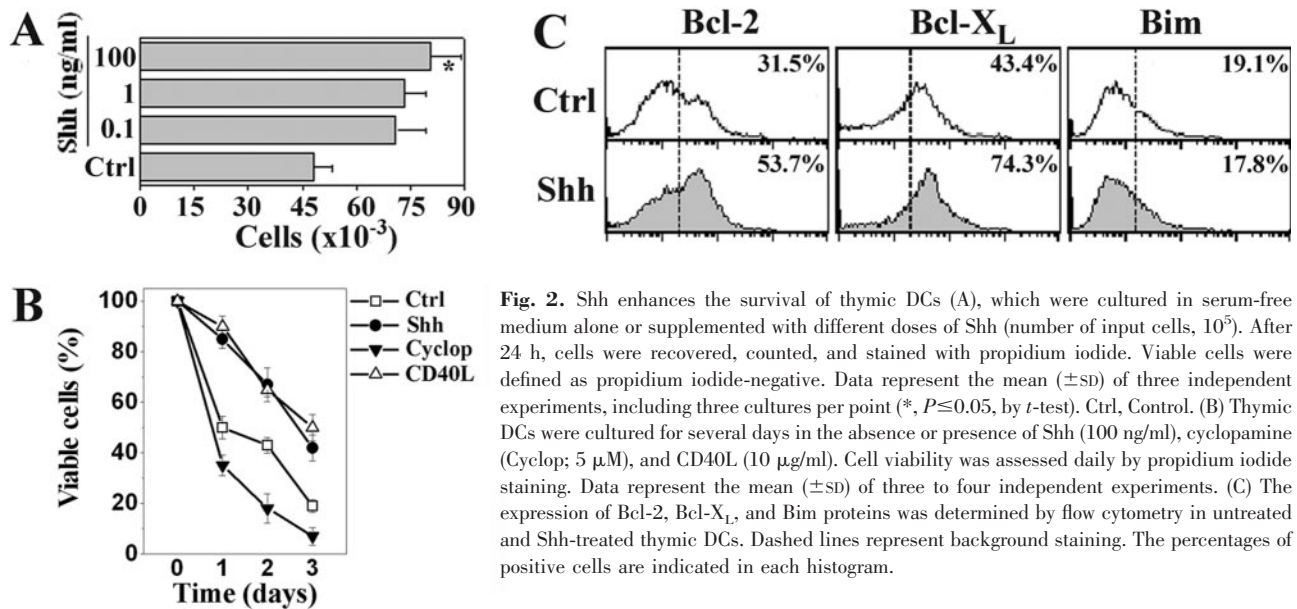
expressed RNAs for Ptc2, a homologue of the Ptc receptor [26], and other Hh-binding proteins with modulating functions [27, 28], such as Hip and Gas1 (Fig. 1C). We also found that thymic DCs expressed specific RNAs for Gli1, Gli2, and Gli3 transcription factors (Fig. 1C), suggesting that the Hh signaling pathway is active in DCs from human thymus.

As Ptc2 expression seems to be associated with Hh-producing cells [29], we assessed the expression of RNAs encoding the mammalian Hh proteins and showed that Shh RNA transcripts were expressed in the thymus DC population (Fig. 1C). The intracytoplasmic expression of Shh protein was analyzed further by flow cytometry, demonstrating that the proportion of Shh-producing DCs was 50–60% (Fig. 1D). We could find no

correlation between Smo expression and Shh production in thymic DCs, as a similar percentage of Shh-producing and nonproducing DCs expressed the Smo receptor (Fig. 1D).

### Shh is a thymic DC survival factor

The relevance of Hh signaling in thymic DCs was assessed further by culturing DCs in serum-free medium supplemented with Shh and evaluating the cell viability. After 24 h, DCs treated with different doses of Shh were always protected from spontaneous cell death compared with untreated cells (Fig. 2A). The viability of control thymic DCs progressively decreased in culture, and by Day 3, a high proportion of DCs was dead. In contrast, the presence of Shh significantly prevented



**Fig. 2.** Shh enhances the survival of thymic DCs (A), which were cultured in serum-free medium alone or supplemented with different doses of Shh (number of input cells, 10<sup>5</sup>). After 24 h, cells were recovered, counted, and stained with propidium iodide. Viable cells were defined as propidium iodide-negative. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of three independent experiments, including three cultures per point (\*,  $P \leq 0.05$ , by *t*-test). Ctrl, Control. (B) Thymic DCs were cultured for several days in the absence or presence of Shh (100 ng/ml), cyclopamine (Cyclop; 5  $\mu$ M), and CD40L (10  $\mu$ g/ml). Cell viability was assessed daily by propidium iodide staining. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of three to four independent experiments. (C) The expression of Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, and Bim proteins was determined by flow cytometry in untreated and Shh-treated thymic DCs. Dashed lines represent background staining. The percentages of positive cells are indicated in each histogram.

DC apoptosis during the whole culture period, being the highest effect detected on Day 3 (Fig. 2B). These antiapoptotic effects were comparable with those induced by CD40 ligation (Fig. 2B).

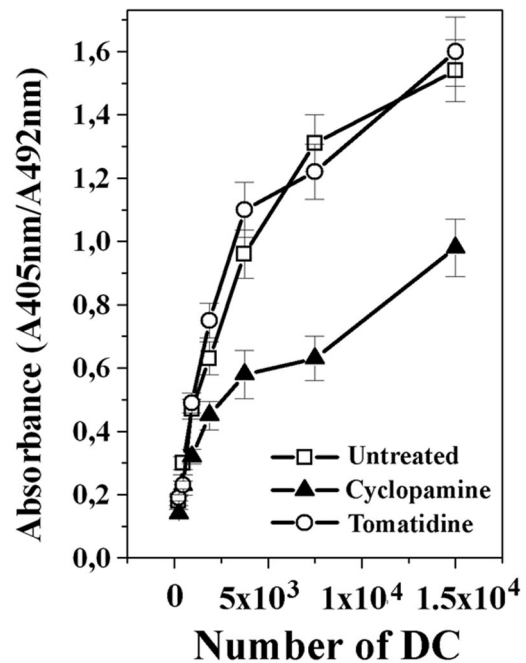
As thymic DCs produce Hh proteins and express Hh receptors, DCs were also treated with cyclopamine, a steroidal alkaloid that binds directly to Smo and induces a conformational shift leading to Smo inactivation and Hh signaling pathway inhibition [30]. The presence of cyclopamine decreased the proportion of viable DCs, and only ~10% of viable cells could be recovered after 3 days of culture. In comparison, the proportion of cell survival in control and Shh-treated cultures was two and six times higher, respectively (Fig. 2B).

It has been previously shown that Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> expression is up-regulated in DCs after CD40 triggering, and this correlates to an increased cell survival [31–33]. To determine whether Shh-dependent stimulation of DC survival was also accompanied by an increased expression of Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>, we analyzed by flow cytometry the expression of antiapoptotic proteins as well as the expression of the proapoptotic Bcl-2 family member Bim, also described to be involved in the regulation of DC survival [32]. We found that Shh treatment led to an up-regulation of Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> protein expression (Fig. 2C). No change was seen in Bim expression (Fig. 2C). These results suggest that Shh, in addition to CD40L, influences thymic DC survival by regulating the expression levels of antiapoptotic Bcl-2 family members.

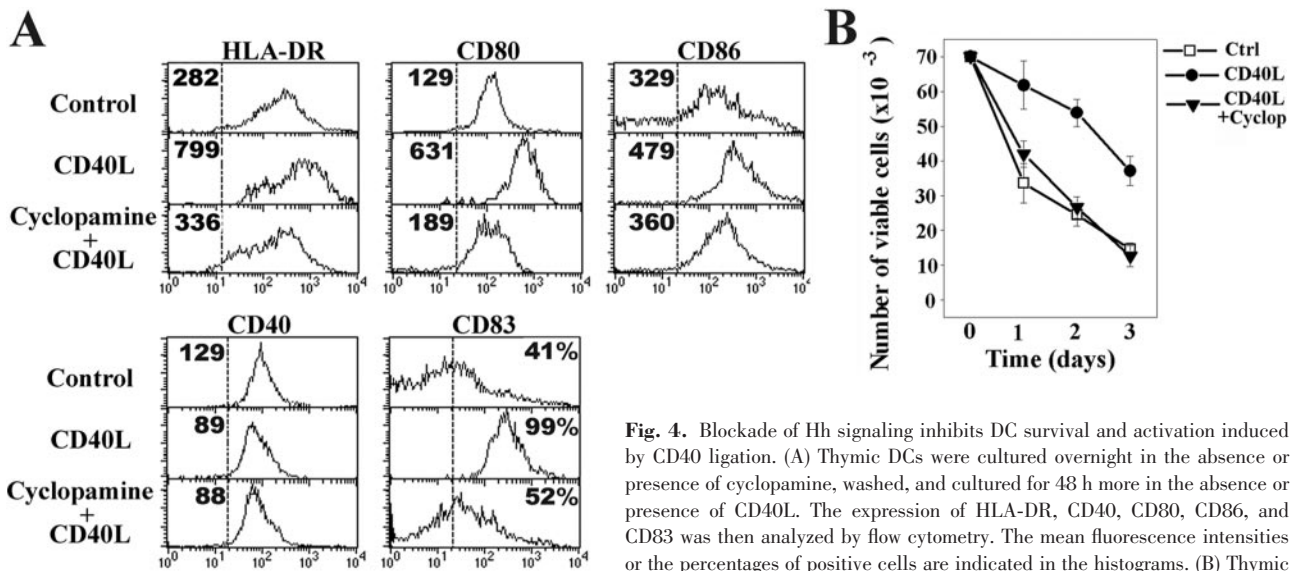
### Inhibition of Hh signaling impairs thymic DC allostimulatory capacity

To evaluate the role of Hh proteins on DC functionality, we analyzed the effects of blocking endogenous Shh signaling in the allostimulatory capacity of DCs. Thymic DCs were pretreated overnight with cyclopamine or the control steroidal alkaloid tomatidine, and equivalent numbers of viable cyclopamine- and tomatidine-treated or untreated DCs were used in

a MLR. The MLR assays revealed a strong suppression of allogeneic stimulatory function of cyclopamine-treated DCs. As shown in **Figure 3**, when  $7.5 \times 10^3$  cyclopamine-treated DCs were added, proliferation was similar to that observed when only  $1.8 \times 10^3$  tomatidine-treated or untreated control DCs were used as stimulatory cells.



**Fig. 3.** T cell stimulatory function of cyclopamine-treated thymic DCs is strongly decreased. Thymic DCs were cultured overnight in the absence or presence of cyclopamine or the control steroidal alkaloid tomatidine and used at different numbers as stimulators for resting allogeneic T cells. After 3 days, the cultures were pulsed for 12 h with BrdU. A specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Full details are given in Materials and Methods. Results are the means ( $\pm$ SD) of the pooled data from five to seven experiments, each with three cultures per point.



**Fig. 4.** Blockade of Hh signaling inhibits DC survival and activation induced by CD40 ligation. (A) Thymic DCs were cultured overnight in the absence or presence of cyclopamine, washed, and cultured for 48 h more in the absence or presence of CD40L. The expression of HLA-DR, CD40, CD80, CD86, and CD83 was then analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensities or the percentages of positive cells are indicated in the histograms. (B) Thymic DCs were cultured for several days in the absence or presence of CD40L and cyclopamine plus CD40L. Cell viability was assessed daily by propidium iodide staining. Data represent the mean ( $\pm$ SD) of two to three independent experiments.

### Hh signaling blockade inhibits DC activation induced by CD40 ligation

Previous reports have pointed out that resting and activated peripheral T cells produce Shh [34, 35]. To avoid the possible effects of T cell-derived Shh on DC function when using MLR assays, we analyzed the effects of cyclopamine pretreatment on CD40-dependent DC activation. As expected, the addition of CD40L to control DC cultures induced a strong up-regulation of the expression levels of HLA-DR and the costimulatory molecules CD86 and CD80. In addition, all DCs acquired CD83 expression (Fig. 4A). Interestingly, the blockade of the Hh signaling pathway by cyclopamine pretreatment abrogated the up-regulation of HLA-DR, CD86, CD80, as well as CD83 expression induced by CD40L on thymic DCs (Fig. 4A). Likewise, cyclopamine also inhibited the survival-promoting effect of CD40L on thymic DCs (Fig. 4B). Therefore, these results suggest that thymic DC activation and survival are dependent on Shh signaling.

### Activated DCs down-regulate Hh receptor expression and Shh production

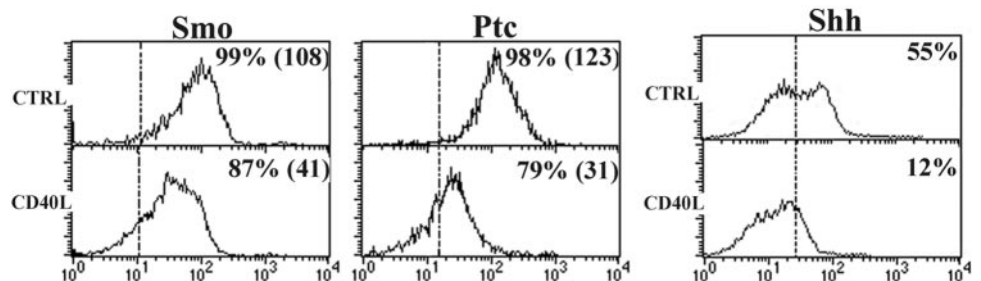
Finally, we analyzed whether the expression of the Hh receptor changes upon DC activation. Our data showed that stimulation by CD40L notably down-regulated the expression levels of the

Hh receptor components (Fig. 5). The proportion of Ptc-expressing DCs was also reduced after activation (Fig. 5). Likewise, when the cytoplasmic expression of Shh was assessed, we found that the proportion of Shh-producing thymic DCs decreased after CD40 ligation (Fig. 5), suggesting that Shh production is down-regulated in activated DCs.

## DISCUSSION

The data presented in this paper further extend our investigation about the role of Hh proteins in the human thymus. Previously, we reported that the components of the Hh signaling pathway exhibit a complex intrathymic expression pattern involving thymic epithelial cells and thymocytes located in the different thymic compartments [15]. Likewise, we showed that Hh proteins function in the maintenance of intrathymic CD34<sup>+</sup> precursor cell populations [17]. Here, we provide evidence that the activity of other key components of the thymus gland, the thymic DCs, is also regulated by the Hh signaling pathway. Thymic DCs express the two components of the Hh receptor, Ptc and Smo, as well as the three members of the Gli protein family. These transcription factors exhibit distinct, although overlapping, functions, and whereas Gli1 is exclusively a Hh-

**Fig. 5.** Down-regulation of the Hh signaling pathway in activated thymic DCs, which were cultured for 24 h in the absence or presence of CD40L, and then the surface expression of Ptc and Smo receptors and the intracellular expression of Shh were determined by flow cytometry. The percentages of positive cells and their mean fluorescence intensities are indicated in the histograms.



dependent activator of Hh targets, Gli2 and Gli3 may function as positive or negative regulators of transcription, although Gli2 acts primarily as a transcriptional activator, and Gli3 functions mainly as a repressor [10, 11]. In addition, thymic DCs express Ptc2, which seems to have functions related but also distinct from its homologue Ptc [36, 37]. These findings suggest the occurrence of complex Hh signaling responses in thymic DCs.

The expression of the Hh-binding proteins Hip and Gas1 by thymic DCs indicates that they have the ability to modulate their own Hh responses, as well as those that take place in neighboring Hh-responsive thymic cells. Hip is a membrane protein, positively regulated by Hh signaling, which competes with Ptc for binding the Hh ligands. Hip does not regulate Smo activity but exclusively sequesters the ligand, consequently attenuating the Hh signaling and forming a negative-feedback loop with Hh ligands [28, 38]. Gas1 is a glycosylphosphatidylinositol-linked membrane glycoprotein, which controls Hh ligand availability by binding to the ligand, and acts as a Hh pathway antagonist [27]. The existence of a significant proportion of thymic DCs, which express Ptc but not Smo at the plasma membrane, suggests that Ptc alone could also participate in the modulation of Hh responses, as apart from repressing Smo signaling, it can function sequestering and internalizing Hh proteins, which limits their availability and creates a barrier to their further movement [39, 40]. The possibility that this Hh internalization is linked to signal transduction has also been proposed [40].

Thymic DCs also synthesize and secrete Shh and constitute together with medullary and subcapsular epithelial cells the main source of Shh in the thymus [15]. Until now, it is unclear whether Shh establishes a functional gradient in the human thymus, as described in other tissues [1, 41]. Nevertheless, it is likely that the differential Shh production and the different modulatory Hh-binding proteins, expressed by thymic DCs and epithelial cells [15], contribute to the appearance of distinct thymic microenvironments, where various Shh concentrations can differentially affect, quantitative and qualitatively, distinct Hh-sensitive thymic cell populations.

We also demonstrate that Shh produced by thymic DCs is used autocrinally to increase their survival. Although many authors have described that different factors, including TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), IL-12, IL-15, GM-CSF, TLR ligands, and CD40 ligation, influence the viability of peripheral DCs [31–33, 42, 43], to our knowledge, only one report has previously investigated this issue with thymic DCs. Vasilijic et al. [44] described that the addition of GM-CSF to rat thymic DC cultures inhibited their apoptosis and in correlation, up-regulated *bcl-2* expression. Our results demonstrate that Shh also promotes thymic DC survival, inducing the up-regulation of the antiapoptotic *bcl-2* and *bcl-X<sub>L</sub>* proteins. The survival-promoting effects of Shh have been reported in other different cell types [17, 34, 45–47], and interestingly, *bcl-2* has been described recently as a Hh target gene, whose transcription is regulated by Gli1 and mainly Gli2 [48, 49]. Although as pointed out above, the regulation of thymic DC survival has been poorly investigated, several authors, using different experimental approaches [50–52], have studied the

lifespan of DCs in the thymus gland. All of these reports agree to conclude that thymic DCs exhibit a rapid turnover of 2–3 weeks, and we here propose that during that time period, Shh could be a main factor involved in promoting thymic DC survival in an autocrine manner.

Thymic DCs play an important role presenting self-antigens and inducing apoptotic death of potentially autoreactive developing T cells [21, 22]. This process requires DC–thymocyte contacts, clearly mediated by CD40–CD40L interactions [53, 54], which induce the survival and activation of DCs [55–57]. An important finding of this work is that an autocrine Shh signaling is required for the CD40-induced survival and activation of thymic DCs, as shown by the fact that the Hh signaling inhibitor cyclopamine abrogates the increase in thymic DC viability and the up-regulation of HLA-DR, CD80, CD86, and CD83 cell markers induced by CD40 ligation. Also in support, the allostimulatory capacity of thymic DCs is notably impaired after blocking Hh signaling with cyclopamine. In contrast, Rowbotham et al. [58] have reported that the intrathymic negative selection of a transgenic TCR was increased in fetal and neonatal *Shh*<sup>-/-</sup> mice. The apparent discrepancy between these results could reflect a differential involvement of Shh signaling in the first processes of deletion of autoreactive thymocytes occurring in the perinatal period, and those taking place in the steady-state adult thymus. Alternatively, species-specific differences in Shh requirement during intrathymic-negative selection could also explain the different results.

The survival of activated thymic DCs and therefore, their functionality must be finely controlled. As described with peripheral DCs, their limited lifespan would be controlled through the maintenance, activation, or silencing of several survival signals [32, 59–61]. Our results also show that activated thymic DCs exhibit a decreased autocrine Shh production as well as a reduced expression of Hh receptors. This down-regulation of Hh signaling would drive to a decrease in thymic DC longevity and would constitute an important mechanism for controlling the turnover and functionality of thymic DCs.

In the future, it would be interesting to examine whether the Hh signaling pathway also regulates the lifespan of peripheral DCs and therefore, whether Hh proteins could be used to control the efficacy of DCs used as vaccines.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2006-00651/BMC and BFU2004-03132 from the Ministerio de Educación y Ciencia, RD06/0010/0003 from the Instituto de Salud Carlos III, and GR85/06-910552 from the Universidad Complutense y Comunidad Autónoma de Madrid. We thank Curis for providing human Shh protein, Dr. W. Gaffield for the gift of cyclopamine, and Dr. F. Villagrà and the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital La Zarzuela and Hospital Madrid-Montepíncipe for the thymus samples.

## REFERENCES

- Ingham, P. W., McMahon, A. P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059–3087.
- McMahon, A. P., Ingham, P. W., Tabin, C. J. (2003) Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* **53**, 1–114.
- Mullor, J. L., Sanchez, P., Altaba, A. R. (2002) Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol.* **12**, 562–569.
- Nieuwenhuis, E., Hui, C. C. (2005) Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin. Genet.* **67**, 193–208.
- Evangelista, M., Tian, H., de Sauvage, F. J. (2006) The Hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5924–5928.
- Dellovade, T., Romer, J. T., Curran, T., Rubin, L. L. (2006) The Hedgehog pathway and neurological disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 539–563.
- Hooper, J. E., Scott, M. P. (2005) Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 306–317.
- Huangfu, D., Anderson, K. V. (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* **133**, 3–14.
- Jia, J., Jiang, J. (2006) Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1249–1265.
- Kasper, M., Regl, G., Frischauf, A. M., Aberger, F. (2006) Gli transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signaling. *Eur. J. Cancer* **42**, 437–445.
- Koebnick, K., Pieler, T. (2002) Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation* **70**, 69–76.
- Ruiz i Altaba, A. (1999) Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* **126**, 3205–3216.
- Outram, S. V., Varas, A., Pepicelli, C. V., Crompton, T. (2000) Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Immunity* **13**, 187–197.
- Varas, A., Hager-Theodorides, A. L., Sacedon, R., Vicente, A., Zapata, A. G., Crompton, T. (2003) The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol.* **24**, 197–206.
- Sacedon, R., Varas, A., Hernandez-Lopez, C., Gutierrez-deFrias, C., Crompton, T., Zapata, A. G., Vicente, A. (2003) Expression of Hedgehog proteins in the human thymus. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 1557–1566.
- Shah, D. K., Hager-Theodorides, A. L., Outram, S. V., Ross, S. E., Varas, A., Crompton, T. (2004) Reduced thymocyte development in Sonic Hedgehog knockout embryos. *J. Immunol.* **172**, 2296–2306.
- Gutierrez-Frias, C., Sacedon, R., Hernandez-Lopez, C., Cejalvo, T., Crompton, T., Zapata, A. G., Varas, A., Vicente, A. (2004) Sonic Hedgehog regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34+ precursor cells. *J. Immunol.* **173**, 5046–5053.
- Hager-Theodorides, A. L., Dessens, J. T., Outram, S. V., Crompton, T. (2005) The transcription factor Gli3 regulates differentiation of fetal CD4–CD8– double-negative thymocytes. *Blood* **106**, 1296–1304.
- El Andaloussi, A., Graves, S., Meng, F., Mandal, M., Mashayekhi, M., Aifantis, I. (2006) Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus. *Nat. Immunol.* **7**, 418–426.
- Ardavin, C. (1997) Thymic dendritic cells. *Immunol. Today* **18**, 350–361.
- Gallegos, A. M., Bevan, M. J. (2006) Central tolerance: good but imperfect. *Immunol. Rev.* **209**, 290–296.
- Wu, L., Shortman, K. (2005) Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin. Immunol.* **17**, 304–312.
- Varas, A., Jimenez, E., Sacedon, R., Rodriguez-Mahou, M., Maroto, E., Zapata, A. G., Vicente, A. (2000) Analysis of the human neonatal thymus: evidence for a transient thymic involution. *J. Immunol.* **164**, 6260–6267.
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D. P., Williams, K. P., Chadwick, K., Ling, L. E., Karanu, F. N., Bhatia, M. (2001) Sonic Hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat. Immunol.* **2**, 172–180.
- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., Taylor, F. R., Wang, E. A., Galdes, A. (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic Hedgehog. *J. Biol. Chem.* **273**, 14037–14045.
- Zaphiropoulos, P. G., Uden, A. B., Rahnama, F., Hollingsworth, R. E., Toftgard, R. (1999) PTCH2, a novel human Patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* **59**, 787–792.
- Lee, C. S., Buttitta, L., Fan, C. M. (2001) Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of Sonic Hedgehog signaling in the somite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11347–11352.
- Chuang, P. T., McMahon, A. P. (1999) Vertebrate Hedgehog signaling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**, 617–621.
- Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, K., Hui, C. (1998) Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic Hedgehog. *Nat. Genet.* **18**, 104–106.
- Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., Beachy, P. A. (2002) Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14071–14076.
- Pirtskhalaishvili, G., Shurin, G. V., Esche, C., Cai, Q., Salup, R. R., Bykovskaia, S. N., Lotze, M. T., Shurin, M. R. (2000) Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins. *Br. J. Cancer* **83**, 506–513.
- Hou, W. S., Van Parijs, L. (2004) A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat. Immunol.* **5**, 583–589.
- Bjorck, P., Banchereau, J., Flores-Romo, L. (1997) CD40 ligation counteracts Fcγ-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int. Immunol.* **9**, 365–372.
- Lowrey, J. A., Stewart, G. A., Lindey, S., Hoyne, G. F., Dallman, M. J., Howie, S. E., Lamb, J. R. (2002) Sonic Hedgehog promotes cell cycle progression in activated peripheral CD4(+) T lymphocytes. *J. Immunol.* **169**, 1869–1875.
- Stewart, G. A., Lowrey, J. A., Wakelin, S. J., Fitch, P. M., Lindey, S., Dallman, M. J., Lamb, J. R., Howie, S. E. (2002) Sonic Hedgehog signaling modulates activation of and cytokine production by human peripheral CD4+ T cells. *J. Immunol.* **169**, 5451–5457.
- Daya-Grosjean, L., Couve-Privat, S. (2005) Sonic Hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett.* **225**, 181–192.
- Rahnama, F., Toftgard, R., Zaphiropoulos, P. G. (2004) Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signaling. *Biochem. J.* **378**, 325–334.
- Chuang, P. T., Kawcak, T., McMahon, A. P. (2003) Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev.* **17**, 342–347.
- Chen, Y., Struhl, G. (1996) Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553–563.
- Incardona, J. P., Lee, J. H., Robertson, C. P., Enga, K., Kapur, R. P., Roelink, H. (2000) Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic Hedgehog by Patched-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12044–12049.
- Gritli-Linde, A., Lewis, P., McMahon, A. P., Linde, A. (2001) The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of Hedgehog signaling peptides. *Dev. Biol.* **236**, 364–386.
- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H. L., Steinman, R. M., Choi, Y. (1997) TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* **186**, 2075–2080.
- Rabinovich, G. A., Riera, C. M., Iribarren, P. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor protects dendritic cells from liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate-induced apoptosis through a Bcl-2-mediated pathway. *Eur. J. Immunol.* **29**, 563–570.
- Vasilijic, S., Colic, M., Vucevic, D. (2003) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is an anti-apoptotic cytokine for thymic dendritic cells and a significant modulator of their accessory function. *Immunol. Lett.* **86**, 99–112.
- Charrier, J. B., Lapointe, F., Le Douarin, N. M., Teillet, M. A. (2001) Anti-apoptotic role of Sonic Hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development* **128**, 4011–4020.
- Cobourne, M. T., Hardesty, Z., Sharpe, P. T. (2001) Sonic Hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J. Dent. Res.* **80**, 1974–1979.
- Cann, G. M., Lee, J. W., Stockdale, F. E. (1999) Sonic Hedgehog enhances somite cell viability and formation of primary slow muscle fibers in avian segmented mesoderm. *Anat. Embryol. (Berl.)* **200**, 239–252.
- Bigelow, R. L., Chari, N. S., Uden, A. B., Spurgers, K. B., Lee, S., Roop, D. R., Toftgard, R., McDonnell, T. J. (2004) Transcriptional regulation of

- bcl-2 mediated by the Sonic Hedgehog signaling pathway through gli-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 1197–1205.
49. Regl, G., Kasper, M., Schnidar, H., Eichberger, T., Neill, G. W., Philpott, M. P., Esterbauer, H., Hauser-Kronberger, C., Frischauf, A. M., Aberger, F. (2004) Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res.* **64**, 7724–7731.
  50. Kampinga, J., Nieuwenhuis, P., Roser, B., Aspinall, R. (1990) Differences in turnover between thymic medullary dendritic cells and a subset of cortical macrophages. *J. Immunol.* **145**, 1659–1663.
  51. Wu, L., Vremec, D., Ardavin, C., Winkel, K., Suss, G., Georgiou, H., Maraskovsky, E., Cook, W., Shortman, K. (1995) Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation. *Eur. J. Immunol.* **25**, 418–425.
  52. Kamath, A. T., Henri, S., Battye, F., Tough, D. F., Shortman, K. (2002) Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* **100**, 1734–1741.
  53. Foy, T. M., Page, D. M., Waldschmidt, T. J., Schoneveld, A., Laman, J. D., Masters, S. R., Tygrett, L., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E., Xu, J. C., Flavell, R. A., Oehen, S., Hedrick, S. M., Noelle, R. J. (1995) An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J. Exp. Med.* **182**, 1377–1388.
  54. Williams, J. A., Sharrow, S. O., Adams, A. J., Hodes, R. J. (2002) CD40 ligand functions non-cell autonomously to promote deletion of self-reactive thymocytes. *J. Immunol.* **168**, 2759–2765.
  55. Vandenabeele, S., Hochrein, H., Mavaddat, N., Winkel, K., Shortman, K. (2001) Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* **97**, 1733–1741.
  56. Bendriss-Vermare, N., Barthelemy, C., Durand, I., Bruand, C., Dezutter-Dambuyant, C., Moulian, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G., Briere, F. (2001) Human thymus contains IFN- $\alpha$ -producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest.* **107**, 835–844.
  57. Schmitt, C., Fohrer, H., Beaudet, S., Palmer, P., Alpha, M. J., Canque, B., Gluckman, J. C., Dalloul, A. H. (2000) Identification of mature and immature human thymic dendritic cells that differentially express HLA-DR and interleukin-3 receptor in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 836–844.
  58. Rowbotham, N. J., Hager-Theodorides, A. L., Cebecauer, M., Shah, D. K., Drakopoulou, E., Dyson, J., Outram, S. V., Crompton, T. (2007) Activation of the Hedgehog signaling pathway in T-lineage cells inhibits TCR repertoire selection in the thymus and peripheral T-cell activation. *Blood* **109**, 3757–3766.
  59. Nopora, A., Brocker, T. (2002) Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J. Immunol.* **169**, 3006–3014.
  60. Hon, H., Rucker III, E. B., Hennighausen, L., Jacob, J. (2004) bcl-xL is critical for dendritic cell survival in vivo. *J. Immunol.* **173**, 4425–4432.
  61. Peng, S., Kim, T. W., Lee, J. H., Yang, M., He, L., Hung, C. F., Wu, T. C. (2005) Vaccination with dendritic cells transfected with BAK and BAX siRNA enhances antigen-specific immune responses by prolonging dendritic cell life. *Hum. Gene Ther.* **16**, 584–593.

# Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development

Teresa Cejalvo,<sup>1</sup> Rosa Sacedón,<sup>2</sup> Carmen Hernández-López,<sup>2</sup> Blanca Díez,<sup>2</sup> Cruz Gutierrez-Frías,<sup>2</sup> Jaris Valencia,<sup>2</sup> Agustín G. Zapata,<sup>1</sup> Alberto Varas<sup>2</sup> and Angeles Vicente<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, and <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02541.x

Received 16 May 2006; revised 30 October 2006; accepted 15 November 2006.

Correspondence: Dr A. Vicente, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain. Email: avicente@bio.ucm.es  
Senior author: A. Vicente

## Summary

T-cell differentiation is driven by a complex network of signals mainly derived from the thymic epithelium. In this study we demonstrate in the human thymus that cortical epithelial cells produce bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and BMP4 and that both thymocytes and thymic epithelium express all the molecular machinery required for a response to these proteins. BMP receptors, BMPRIA and BMPRII, are mainly expressed by cortical thymocytes while BMPRIIB is expressed in the majority of the human thymocytes. Some thymic epithelial cells from cortical and medullary areas express BMP receptors, being also cell targets for *in vivo* BMP2/4 signalling. The treatment with BMP4 of chimeric human–mouse fetal thymic organ cultures seeded with CD34<sup>+</sup> human thymic progenitors results in reduced cell recovery and inhibition of the differentiation of human thymocytes from CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> to CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cell stages. These results support a role for BMP2/4 signalling in human T-cell differentiation.

**Keywords:** bone morphogenetic protein; human thymus; thymic epithelial cells; thymocytes

## Introduction

T-cell differentiation involves a highly ordered and strictly regulated maturation programme that requires the specific microenvironment provided by the thymus. The thymus is a lobulated lymphoepithelial organ, every thymic lobule being composed of two distinct zones, the cortex and the medulla. The cortex is separated from the connective capsule by a superficial layer of flattened and tightly joined epithelial cells that form the subcapsule. Each of these thymic compartments provides a different microenvironment appropriate to the specific processes that occur during T-cell development.<sup>1–3</sup> In humans, the haematopoietic progenitors that seed the postnatal thymus are CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> double-negative (DN) cells that express high levels of the antigen CD34. These cells have the capacity to differentiate into multiple cell lineages including T cells, dendritic cells (DCs), natural killer

(NK) cells and monocytes.<sup>3,4</sup> Thymic progenitors enter the thymus through the perimedullary cortical venules, and migrate across the cortex before accumulating in the subcapsular zone, undergoing progressive developmental changes during this process.<sup>5</sup> T-cell-lineage-committed precursors (CD34<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> CD1<sup>+</sup>) give rise to immature single-positive CD34<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> cells that differentiate into CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> double-positive (DP) cells, located in the cortex of the thymus. This is a heterogeneous cell population that represents the majority of thymocytes and includes cells that are rearranging their T-cell receptor  $\beta$  (TCR- $\beta$ ) gene as well as others that already express cytoplasmic TCR- $\beta$  chain.<sup>4,6</sup> Upon productive TCR- $\alpha$  gene rearrangement, DP TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells die unless they are positively selected after the occurrence of low-affinity recognition of self-peptide–major histocompatibility complex (MHC) complexes expressed by the thymic epithelium. In contrast, those thymocytes showing high affinity

Abbreviations: BMP, bone morphogenetic protein; bp, base pair; DC, dendritic cell; DN, double-negative CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>; DP, double-positive CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>; FITC, fluorescein isothiocyanate; Hh, Hedgehog; hu-mo FTOC, chimeric human–mouse fetal thymic organ cultures; HLA, human leucocyte antigen; IgG, immunoglobulin G; mAb, monoclonal antibody; MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer; RT-PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction; SP, single-positive CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>/CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> TCR- $\beta$ , T-cell receptor  $\beta$ .