

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**Estudio de la interacción de glucocorticoides, citoquinas y factores  
de transcripción en la regulación del fenotipo del linfocito T de  
ayuda**

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Bioquímica Ana Liberman  
**Director de tesis: Prof. Dr. Eduardo Arzt**

**LABORATORIO DE FISIOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR  
FCEN-UBA**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2007**

**Estudio de la interacción de glucocorticoides, citoquinas y factores de transcripción en la regulación del fenotipo del linfocito T de ayuda**

Jurado 1: Dra. Rosa Wainstock

Jurado 2: Dr. Norberto Zwirner

Jurado 3: Dra. Adalí Pesci

## RESUMEN

La acción antiinflamatoria e inmunosupresora de los glucocorticoides (GC) involucra la regulación de la actividad de varios factores de transcripción (FT) como ser NF- $\kappa$ B, AP-1, NFAT y miembros de la familia STAT. Los FT T-bet y GATA-3 son claves para la adquisición del fenotipo T de ayuda 1 (Th1) y T de ayuda 2 (Th2) respectivamente. Los GC regulan la producción de citoquinas Th1 y Th2 y favorecen un shift hacia la diferenciación del linaje Th2.

En esta tesis estudiamos la regulación por GC de dichos FT y cual es el mecanismo molecular intrínseco implicado en dicha regulación.

En experimentos de transfección en los que usamos como blancos de la actividad de T-bet y de GATA-3 los promotores de IFN- $\gamma$  y de IL-5 respectivamente y también directamente los elementos de respuesta de T-bet y de GATA-3 clonados río arriba del gen de la luciferasa, vimos que los GC inhiben fuertemente y de manera dosis dependiente la actividad transcripcional de T-bet y también, en menor medida, la de GATA-3. La acción de los GC es revertida por el antagonista, RU38486, mostrando la especificidad del receptor de glucocorticoides (GR) en la inhibición. Estudios de coimmunoprecipitación muestran que la interacción proteína-proteína entre el GR y T-bet esta involucrada en la inhibición de la actividad transcripcional de T-bet. Además, ensayos de EMSA muestran que los GC inhiben la unión de T-bet al DNA, lo cual se muestra también en el contexto celular por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. Al contrario, GATA-3 no interactúa directamente con el GR, pero la actividad transcripcional directa de GATA-3 sobre los elementos de respuesta de GATA-3 es inhibida por GC sin afectar el pegado de GATA-3 al DNA. Bajo condiciones de activación los GC inhibirían la actividad de GATA-3 inhibiendo la fosforilación inducida por PKA/p38 MAPK. Además vimos que en cultivos primarios de esplenocitos de ratón, los GC inhiben tanto la expresión del RNAm y la proteína de ambos, T-bet y GATA-3. De manera consistente con su acción inmunosupresora, los GC inhiben tanto la expresión como la actividad transcripcional de los factores de transcripción claves T-bet y GATA-3, pero por medio de diferentes mecanismos moleculares.

Esta tesis aporta a la comprensión de la regulación del fenotipo Th1/Th2 mediada por GC.

Palabras Claves: GR, T-bet, GATA-3, inmunosupresión, diferenciación Th

## ABSTRACT

Glucocorticoid (GC) immunosuppressive and anti-inflammatory action involves the regulation of several transcription factors (TF) such as NF- $\kappa$ B, AP-1, NFAT and STAT family members. Transcription factors T-bet and GATA-3 are pivotal for the acquisition of Th1 or Th2 phenotype, respectively. GC regulate both Th1 and Th2 cytokines and favor a shift towards Th2 differentiation.

In this thesis we study GC regulation of these master TF and the intrinsic molecular mechanism involved in this regulation.

GC strongly inhibit dose-dependently T-bet and to a lesser degree, GATA-3 transcriptional activity in transfection experiments using as targets of T-bet and GATA-3 activity the IFN- $\gamma$  and IL-5 promoters respectively and also directly the T-bet and GATA-3 response elements cloned upstream of the luciferase gene. GC action is reverted by the antagonist, RU38486, showing the glucocorticoid receptor (GR) specificity in the inhibition. Coimmunoprecipitation studies show that protein-protein interaction between GR and T-bet is involved in the inhibition of T-bet transcriptional activity. Furthermore, EMSA assays show that GC inhibit T-bet-DNA binding, which is shown also in the cell context by chromatin immunoprecipitation assays. On the contrary, GATA-3 does not directly interact with the GR but the direct transcriptional activity of GATA-3 on GATA-3 response elements is inhibited by GC without affecting the binding of GATA-3 to the DNA. Under activating conditions, GC may inhibit GATA-3 activity due to the inhibition of GATA-3 phosphorylation triggered by PKA/p38 MAPK. Furthermore, in naive mice splenocyte cultures, GC inhibit both T-bet and GATA-3 mRNA and protein expression. Consistent with its immunosuppressive action, GC inhibit both T-bet and GATA-3 master transcription factors expression and transcriptional activity, but by means of different molecular mechanisms.

All together this thesis contributes to the understanding of GC mediated regulation of Th1/Th2 phenotype.

Key words: GR, T-bet, GATA-3, immunosuppression, Th differentiation.

## *AGRADECIMIENTOS*

A Eduardo Arzt, mi director de tesis, sin el cual esta tesis no se podría haber llevado a cabo ni las publicaciones que la acompañan. Gracias por la oportunidad de trabajar y ser parte de su grupo.

A mis compañeros, a Juan, Matías, Alberto y Susana. En especial a Damiana y Jimena, no solo por ser excelentes compañeras y personas sino también por su paciencia y aguante, por su amistad.

A los que no están que fueron una ayuda invaluable para mi formación, a Carolina, Damian K, y en especial Damian Refojo.

A los chicos ARK/Srebrow/Coso, en especial a Petri, Fede, Manu, Manolo, Nacho, Juan, Mati, Mariano, Vale y Tami, por su ayuda incondicional en el diseño y discusión de experimentos, material de laboratorio, etc, pero en especial por su buena onda y paciencia y también a sus directores, Alberto, Anabella y Omar.

A mis amigas de la vida, a la Negra, Laurita, Vale I y Vale V.

Por último, pero no menos importantes...

*a mis viejos, a Juli y familia que son mi familia.*

*GRACIAS*

# ÍNDICE

---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	17
------------------------	----

---

<b>I.1. MARCO CONCEPTUAL</b>	18
<b>I.2. CITOQUINAS, FENOTIPO Y DIFERENCIACIÓN</b>	21
<b>I.3. FACTORES QUE INFLUENCIAN LA DIFERENCIACIÓN DEL LINFOCITO T HELPER</b>	22
I.3.1. Células presentadoras de antígenos, antígenos, co-estimulación	23
I.3.2. Citoquinas	24
I.3.3. Diferentes modelos que intentan explicar la diferenciación del linfocito T helper	25
<b>I.4. DESARROLLO DEL LINAJE T HELPER 1</b>	27
I.4.1. Rol de STAT-4 en la diferenciación T helper 1	27
I.4.2. Rol de IL-12	28
I.4.3. Regulación transcripcional de las citoquinas T helper 1 específicas	29
I.4.3.1. IL-2	29
I.4.3.2. IFN- $\gamma$	29

I.4.4. T-bet, un factor de transcripción que controla la transcripción de IFN- $\gamma$ y la diferenciación del linaje T helper 1	30
<b>I.5. DESARROLLO DEL LINAJE T HELPER 2</b>	34
I.5.1. Caminos de señalización	34
I.5.2. Regulación transcripcional de citoquinas T helper 2 específicas	35
<i>I.5.2.1. IL-4</i>	35
<i>I.5.2.2. IL-5</i>	36
I.5.3. Factores de transcripción T helper 2 específicos	38
<i>I.5.3.1. c-Maf</i>	38
<i>I.5.3.2. GATA-3</i>	39
<b>I.6. GLUCOCORTICOIDES</b>	41
I.6.1. Glucocorticoides naturales	41
I.6.2. Glucocorticoides sintéticos	43
I.6.3. Estructura del receptor de Glucocorticoides	43
I.6.4. Bases moleculares de la acción de Glucocorticoides	44
I.6.5. Regulación de la actividad inmune por Glucocorticoides	47
<i>I.6.5.1. Regulación de receptores de citoquinas por Glucocorticoides</i>	48
<i>I.6.5.2. Interacción molecular entre el receptor de glucocorticoides y citoquinas inflamatorias: Rol de los factores de transcripción</i>	49

<i>I.6.5.3. Importancia de la fosforilación de factores de transcripción y de la interacción entre los caminos de señalización mediada por quinasas y los Glucocorticoides</i>	54
--	----

<i>I.6.5.4. Importancia del remodelado de la cromatina en la interacción entre Glucocorticoides y Factores de Transcripción en la expresión génica</i>	55
--	----

<b>I.7. ROL DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA DIFERENCIACIÓN T HELPER</b>	57
---	----

---

<b>II. OBJETIVOS</b>	59
----------------------	----

---

II.1. OBJETIVOS	60
-----------------	----

---

<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	61
----------------------------------	----

---

<b>III.1. APARATOS, ESTÍMULOS, ANTICUERPOS E INHIBIDORES</b>	62
--	----

III.1.1. Aparatos o dispositivos especiales	62
---	----

III.1.2. Estímulos, hormonas e inhibidores farmacológicos	62
---	----

III.1.3. Anticuerpos, citoquinas y productos relacionados	62
---	----

III.1.4. Mitógenos	64
--------------------	----



III.1.5. Otros reactivos o materiales	64
<i>III.1.5.1. Estímulos utilizados</i>	65
<b>III.2. ANIMALES</b>	65
III.2.1. Condiciones de crianza y alojamiento	65
<b>III.3. CULTIVOS CELULARES</b>	66
III.3.1. Cultivos primarios	66
<i>III.3.1.1. Cultivos primarios de esplenocitos de ratón</i>	66
<i>III.3.1.2. Purificación de células T</i>	66
<i>III.3.1.3. Enriquecimiento en la expresión de T-bet de células T</i>	67
III.3.2. Líneas celulares	67
<b>III.4. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS</b>	68
III.4.1. ELISA de Interleuquina-5 e IFN- $\gamma$	68
<b>III.5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR</b>	69
III.5.1. Evaluación de la viabilidad celular por microscopía de fluorescencia	69
<b>III.6. TRANSFECCIONES TRANSIENTES DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN</b>	70
<b>III.7. MÉTODOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	71
III.7.1. Plásmidos Utilizados	71
<i>III.7.1.1. Plásmidos Reporteros</i>	71
<i>III.7.1.2. Vectores de Expresión</i>	72

III.7.2. Subclonados realizados	74
III.7.3. Manejo de Plásmidos	76
<i>III.7.3.1. Preparación de Bacterias Competentes</i>	76
<i>III.7.3.2. Transformación Bacteriana y Aislamiento de Plásmidos</i>	76
<i>III.7.3.3. Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones</i>	77
<i>III.7.3.4. Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción</i>	77
<i>III.7.3.5. Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxi-Mega preparaciones</i>	78
<i>III.7.3.6. Purificación de fragmentos de ADN</i>	78
<i>III.7.3.6.1. Marcación de Sondas: Método de extensión del primer</i>	79
III.7.4. Análisis del RNAm por ensayos de Northern Blot	80
<i>III.7.4.1. Extracción del RNAm</i>	80
<i>III.7.4.2. Electroforesis del RNA por el método de glioxal</i>	81
<i>III.7.4.3. Transferencia del RNA a una membrana de Nylon</i>	81
<i>III.7.4.4. Hibridización con sondas radiactivas</i>	82
<i>III.7.4.5. Lavado de las membranas de nylon para su reutilización posterior</i>	82
III.7.5. Análisis del RNAm por PCR	83
<i>III.7.5.1. Transcripción Reversa</i>	83
<i>III.7.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	83
<i>III.7.5.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real</i>	84

III.7.5.3.1. Ensayos de estabilidad del RNAm	85
III.7.6. Western Blot	86
III.7.6.1. Obtención de extractos celulares	86
III.7.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia y revelado	86
III.7.7. Ensayos de coimmunoprecipitación	87
III.7.8. Ensayos de retardo en gel (EMSA)	88
III.7.9. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	89
<b>III.8. MÉTODOS BIOQUÍMICOS</b>	91
III.8.1. Análisis de las transfecciones	91
III.8.1.1. Preparación de extractos celulares para detección de actividad Luciferasa- $\beta$ -Galactosidasa	91
III.8.1.2. Ensayo de actividad luciferasa	91
III.8.1.3. Ensayo de actividad $\beta$ -Galactosidasa	91
<b>III.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	92
<hr/>	
<b>IV. RESULTADOS</b>	93
<hr/>	

#### IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN T HELPER 1, T-BET 95

IV.1.1. Los Glucocorticoides inhiben la expresión del RNAm de T-bet y esta inhibición es revertida por la citoquina diferenciadora T helper 1 IL-12	95
IV.1.2. Los Glucocorticoides inhiben la síntesis proteica de T-bet	102
IV.1.3. Los Glucocorticoides inhiben la actividad transcripcional de T-bet	103
<i>IV.1.3.1. Asociación física entre el receptor de glucocorticoides y T-bet exógenos</i>	106
<i>IV.1.3.2. Asociación física entre el receptor de glucocorticoides y T-bet endógenos</i>	108
<i>IV.1.3.3. Inhibición transcripcional mutua entre Glucocorticoides y T-bet</i>	110
<i>IV.1.3.4. La inhibición por GC de la actividad transcripcional de T-bet se lleva a cabo por un mecanismo de transrepresión</i>	112
<i>IV.1.3.5. La mutación S425G en el receptor de glucocorticoides afecta su capacidad de interactuar físicamente con T-bet</i>	114
IV.1.4. Los Glucocorticoides inhiben la unión de T-bet a sus elementos de respuesta en el DNA	115
IV.1.5. Los Glucocorticoides inhiben la actividad transcripcional de T-bet sobre el promotor de Interferon- $\gamma$	118

<b>PARTE B</b>	123
<b>IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN T HELPER 2, GATA-3</b>	123
IV.2.1. Los Glucocorticoides inhiben la expresión del RNAm de GATA-3 y esta inhibición es revertida por la citoquina diferenciadora T helper 2 IL-4	123
IV.2.2. Los Glucocorticoides inhiben la síntesis proteica de GATA-3	128
IV.2.3. Los Glucocorticoides inhiben la actividad transcripcional de GATA-3	129
<i>IV.2.3.1. El receptor de glucocorticoides y GATA-3 no interaccionan físicamente</i>	132
IV.2.4. Los GC no inhiben la unión de GATA-3 a sus elementos de respuesta en el DNA	133
IV.2.5. AMPc induce la actividad transcripcional de GATA-3 vía la señalización por proteín quinasa A (PKA) y la proteín quinasa activada por mitógenos p38	135
IV.2.6. Los Glucocorticoides inhiben la actividad transcripcional de GATA-3 inducida por AMPc inhibiendo la vía proteín quinasa A (PKA)-proteín quinasa activada por mitógenos p38	136
IV.2.7. Los Glucocorticoides no inhiben la fosforilación de la proteín quinasa activada por mitógenos p38	139
IV.2.8. Los Glucocorticoides inhiben la fosforilación de GATA-3	140
IV.2.9. Los GC inhiben la actividad transcripcional de GATA-3 sobre el promotor de IL-5	141

---

<b>V. DISCUSIÓN</b>	146
---------------------	-----

---

<b>PARTE A</b>	147
----------------	-----

<b>V.1. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN T HELPER 1, T-BET</b>	147
---	-----

<b>PARTE B</b>	154
----------------	-----

<b>V.2. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN T HELPER 2, GATA-3</b>	154
--	-----

<b>PARTE C</b>	159
----------------	-----

<b>V.3. INHIBICIÓN DIFERENCIAL T-BET/GATA-3. IMPLICANCIA FARMACOLÓGICA/CONCLUSIONES</b>	159
---	-----

---

<b>VI. REFERENCIAS</b>	165
------------------------	-----

---

## ABREVIATURAS

---

AMPC	AMP cíclico
AP-1	proteína activada 1 "activated protein 1"
CPA	célula presentadora de antígenos
APS	persulfato de amonio
β-gal	beta-galactosidasa
BSA	seroalbúmina bovina
cAMP	AMP cíclico
Con A	concanavalin A
DBD	dominio de unión al DNA
Dex	Dexametasona
FT	factor de transcripción
GC	glucocorticoides
GR	receptor a glucocorticoides
GRE	elemento respondedor a glucocorticoides
HPA	hipotálamo-pituitario-adrenal
IL-	interleuquina
IFN-γ	interferon-gamma
JNK	Jun quinasa
KCl	cloruro de potasio
LBD	dominio de unión a ligando
Luc	luciferasa
MAPK	quinasa activada por mitógenos
P38 MAPK	quinasa activada por mitógenos p38
min	minutos
seg	segundos
hs	horas
RNAm	RNA mensajero

NFAT	factor nuclear de células T activadas
NF-kB	factor nuclear kB
nGRE	elemento respondedor negativo a glucocorticoides
GRE	elemento respondedor a glucocorticoides
PKA	proteín quinasa A
RSV	promotor de virus de sarcoma
CMV	promotor del citomegalo virus
SNC	sistema nervioso central
TCR	receptor de células T
TNF-	factor de necrosis tumoral
PMA	ésteres de forbol
Th	linfocito T de ayuda
EMSA	electrophoretic mobility shift assays
ChIP	ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina
STAT	signal transducers and activators of transcription
HC	Hidrocortisona
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad



# I. INTRODUCCIÓN

---

## I.1. MARCO CONCEPTUAL

La inmunidad innata se pone en juego como primera barrera frente a la invasión microbiana. Sin embargo, la inmunidad innata carece de la especificidad y la memoria que caracterizan a la inmunidad específica. El poseer especificidad y memoria significa que una segunda exposición al mismo agente invasor producirá una respuesta inmune más rápida y de mayor intensidad. La base celular de la inmunidad específica está estructurada sobre tres tipos de células: célula presentadora de antígeno (CPA), linfocitos T y linfocitos B. Las CPA están representadas por un grupo heterogéneo de células que tienen en común la capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T. Los linfocitos B y T se originan de un precursor común en la médula ósea. Los linfocitos B completan su maduración en la misma para luego ser exportados a los órganos linfáticos secundarios como linfocitos B vírgenes (previo al encuentro del antígeno). Los linfocitos T en cambio, migran de la médula ósea al timo, donde completan su maduración. Los linfocitos T maduros son exportados luego a los órganos linfoides secundarios, ocupando en los mismos las denominadas áreas timo dependientes. Los linfocitos T se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas, los linfocitos T de ayuda  $CD4^+$  (Th) y las células T citotóxicas  $CD8^+$  (LTc). El sistema inmune puede enfrentar al agente invasor utilizando mecanismos humorales o celulares. En el primer caso los linfocitos B se diferencian a plasmocitos que mediante la liberación de anticuerpos a la circulación o mucosas tienen a su cargo la eliminación o neutralización del agente invasor. Esto constituye la inmunidad humoral. En la inmunidad celular las células T inician la respuesta inmune reconociendo al antígeno y luego de una fase de activación y diferenciación eliminan directamente al agente invasor. Los linfocitos T muestran una particular especificidad hacia los antígenos: reconocen solo antígenos unidos a proteínas que se codifican en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y se expresan en la superficie de otras células. Como resultado de ello, estas células T reconocen y responden a antígenos asociados a la superficie celular. En respuesta a la estimulación antigénica, las células Th secretan péptidos llamados citoquinas cuya función es promover la proliferación y diferenciación de las células B y los propios T. Las citoquinas también atraen y activan a los leucocitos inflamatorios, incluidos macrófagos y granulocitos, proporcionando importantes conexiones entre la inmunidad específica de las células T y la inmunidad innata. Los LTc lisan a las células que producen antígenos extraños, como las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares.

Tanto los linfocitos T como los B sufren complicados patrones de diferenciación desde células no diferenciadas o precursores no funcionales a células efectoras altamente sofisticadas. Uno de los ejemplos más claros y elegantes de esto es el desarrollo de los linfocitos Th. Hace ya más de una década, se descubrió que los linfocitos Th nativos CD4<sup>+</sup> (Th0), funcionalmente inmaduros y capaces de secretar solo IL-2, cuando reciben un estímulo antigénico, se diferencian en dos subsets distintos definidos por su función y por su perfil único de expresión de citoquinas (Mosmann y Coffman, 1989). Estos subsets, Th1 y Th2 son responsables de las respuestas mediadas por células y de las respuesta inflamatorias inmunes y humorales, respectivamente (Fig. 1). La función de las células Th puede ser explicada por las citoquinas que secretan. Las citoquinas son pequeños péptidos parecidos a hormonas que tienen actividades biológicas pleiotrópicas en varios tipos celulares distintos. Las células T en reposo no transcriben genes para citoquinas, pero son rápidamente inducidas a través de la activación vía el receptor T (TCR) y receptores co-estimulatorios (Lenschow et al., 1996). Se ha progresado mucho en la identificación de los caminos de señalización y factores de transcripción (FT) que controlan la diferenciación Th1 y Th2 (Fig. 2).

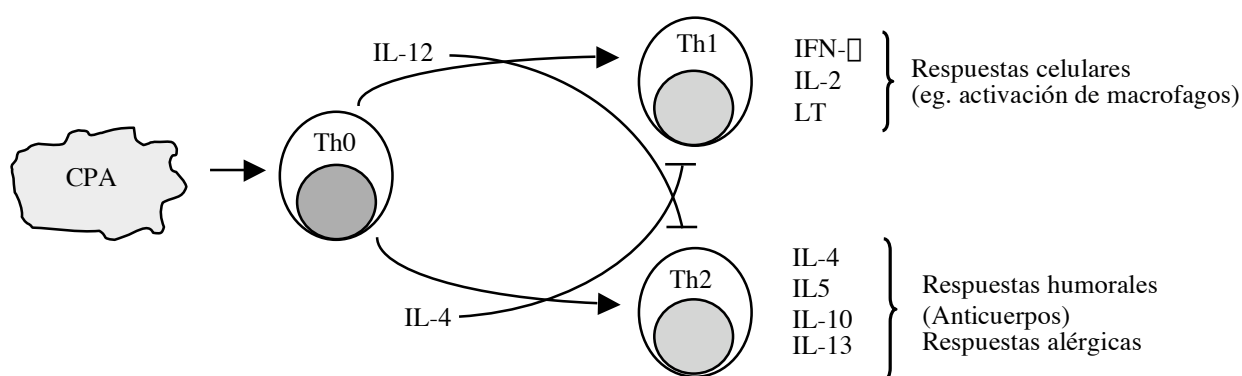
Existen muchos factores que influyen en la diferenciación Th. Un factor muy importante es el entorno de citoquinas (Mosmann y Coffman, 1989; Abbas et al., 1996) y la expresión de FT claves como T-bet y GATA-3 (Szabo et al., 2002; Zhu et al., 2004). Dos citoquinas críticas que influyen en la diferenciación Th son IL-12 (Th1) e IL-4 (Th2). Estas citoquinas son capaces de generar la diferenciación de su propio subset y al mismo tiempo inhiben la generación del subset opuesto (Maggi et al., 1992; Hsieh et al., 1993).

T-bet y GATA-3 son conocidos como reguladores “maestros” de la diferenciación Th (Szabo et al., 2002; Zhu et al., 2004). Estos FT son selectivamente expresados en las células Th1 y Th2 (Zhang et al., 1997b; Szabo et al., 2000). La expresión ectópica de GATA-3 aumenta la producción de citoquinas Th2 (Zheng y Flavell, 1997; Ferber et al., 1999) y al mismo tiempo GATA-3 inhibe la polarización Th1 y la producción de las respectivas citoquinas (Ouyang et al., 1998; Ferber et al., 1999). Del mismo modo, la expresión ectópica de T-bet en células Th2 genera células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  y también puede inhibir la producción de citoquinas Th2 (Szabo et al., 2000).

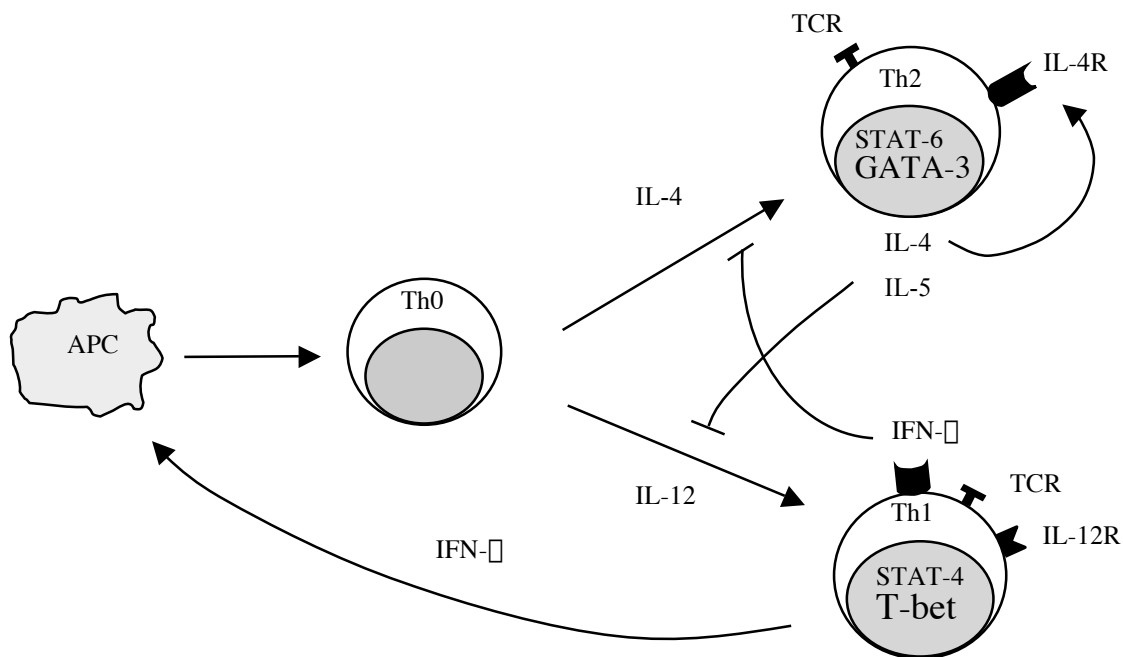
Durante el desarrollo de una respuesta inmune se produce un aumento de los niveles de citoquinas y de glucocorticoides (GC) (Besedovsky et al., 1986). Por un lado el aumento de citoquinas es clave para desarrollar una respuesta inmune adecuada dirigida a eliminar el

patógeno, por otro lado, el aumento de GC previene una reacción inmunológica exacerbada ejerciendo sus acciones inmunosupresivas y antiinflamatorias mediante la inhibición tanto de la expresión de citoquinas como sus acciones pleiotrópicas en células blanco (Cupps y Fauci, 1982; Cippitelli et al., 1995; Kovalovsky et al., 1998; Ashwell et al., 2000). Por un lado una variedad de trabajos han descrito la polarización hacia el linaje Th2 luego de la administración de GC (Bertoglio y Leroux, 1988; Daynes y Araneo, 1989; Brinkmann y Kristofic, 1995; Blotta et al., 1997; Dozmorov y Miller, 1998; Ramirez, 1998; Visser et al., 1998; Miyaura y Iwata, 2002), mientras que otros trabajos muestran que los GC inhiben la expresión de citoquinas Th2 (Wang et al., 1993; Mori et al., 1997b; Franchimont et al., 1998; Biola et al., 2000; Chen et al., 2000c; Quan et al., 2001; Hu et al., 2003).

Además de la interacción entre GC y el factor nuclear de células T activadas (NFAT) en el promotor de IL-5 (Chen et al., 2000c; Quan et al., 2001), el activador proteico 1 (AP-1) o el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Mori et al., 1997b), la interacción entre el receptor de glucocorticoides (GR) y el transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT-6) (Biola et al., 2000), y la inhibición de la fosforilación de STAT-4 por GC (Franchimont et al., 2000), existe muy poca evidencia acerca del mecanismo molecular subyacente involucrado en la participación de GC en la polarización Th que es el objeto de estudio de esta tesis. Por ello, en la introducción nos focalizaremos en la descripción de los principales agentes involucrados en la diferenciación T y en los mecanismos de acción inmune de los GC.



**Figura 1: Diferentes fenotipos de los linfocitos Th.** Luego de la estimulación antigénica, los linfocitos Th0 o nativos se diferencian hacia el linaje Th1 que media respuestas celulares (por ejemplo mediando la activación de macrófagos) contra patógenos intracelulares o Th2 que median respuestas humorales (anticuerpos) contra patógenos extracelulares como parásitos helmínticos y respuestas alérgicas. Se caracterizan por el patrón de citoquinas que secretan y la presencia de FT (fig. 2). Los linfocitos Th1 secretan principalmente IFN- $\gamma$  linfotóxica (LT) e IL-2 y los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Las citoquinas diferenciadoras Th1 como IL-12 o Th2 como IL-4 promueven la diferenciación de su respectivo linaje inhibiendo la diferenciación del linaje opuesto.



**Figura 2: FT maestros que influyen la diferenciación Th.** Luego de la estimulación antigénica, los linfocitos Th0 se diferencian hacia el linaje Th1 o Th2. El linaje Th1 secreta citoquinas específicas como IFN- $\gamma$  y expresa selectivamente el FT T-bet, y el linaje Th2 secreta citoquinas específicas como IL-4 e IL-5 y expresa selectivamente el FT GATA-3, claves para la adquisición de sus respectivos linajes. Las citoquinas diferenciadoras Th1 como IL-12 o Th2 como IL-4 promueven la diferenciación de su respectivo linaje inhibiendo la diferenciación del linaje opuesto. Del mismo modo, los FT GATA-3 y T-bet son claves para la adquisición de los respectivos linajes promoviendo la expresión de los programas genéticos propios y al mismo tiempo inhibiendo los programas genéticos del linaje opuesto.

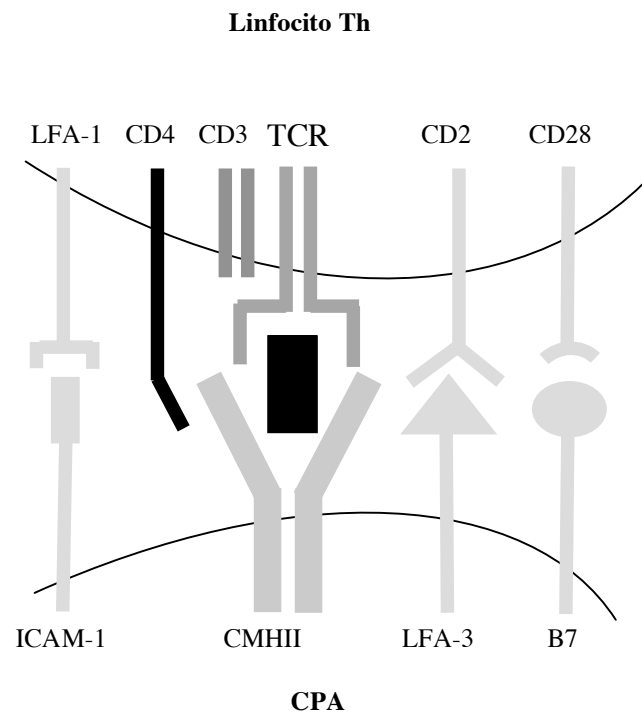
## I.2. CITOQUINAS, FENOTIPO Y DIFERENCIACIÓN

Las diferencias funcionales entre los subsets de linfocitos Th pueden ser explicadas por las acciones de las citoquinas linaje-específicas. De este modo, la principal citoquina producida por el linaje Th1 es IFN- $\gamma$  además las células Th1 también producen IL-2 y linfoxina (LT) (Fig. 1), citoquinas que median respuestas de hipersensibilidad retardada y la activación de macrófagos. La principal citoquina Th2 es IL-4, y las células Th2 también secretan IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (Fig. 1), citoquinas que ayudan al linfocito B a diferenciarse en plasmocito secretor de anticuerpos y que son críticas en las respuestas alérgicas (Arthur y Mason, 1986; Paliard et al., 1988; Mosmann y Coffman, 1989; Paul y Seder, 1994). La mejor forma para distinguir fenotípicamente a estos dos subsets es por su perfil único de citoquinas y éste puede ser determinado por tinción intracelular de IFN- $\gamma$  e IL-4.

### **I.3. FACTORES QUE INFLUENCIAN LA DIFERENCIACIÓN DEL LINFOCITO T HELPER**

La mayoría de las células Th expresan una proteína de superficie llamada CD4. El CD4 es una molécula accesoria que sirve como molécula de adhesión debido a su afinidad específica por las moléculas de clase II del CMH, además puede transducir señales o ayudar a transducir señales, ambas funciones claves para la activación de las células Th. Las células T reconocen antígenos sólo sobre la superficie de las CPA en asociación a los productos de los genes del CMH propio. Los linfocitos Th CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos asociados a los productos de genes de clase II del CMH. Los LTc o CD8<sup>+</sup> reconocen antígenos asociados a los productos de los genes de clase I. Las CPA internalizan, procesan y presentan antígenos extraños en el contexto del CMH apropiado para ser reconocidas por las células T. El TCR proporciona a éstas células la capacidad de reconocer antígenos peptídicos unidos a las moléculas del CMH, pero tanto la expresión del TCR como sus funciones en la activación de las células T dependen de otras proteínas asociadas como las CD3. Las proteínas CD3 forman parte del complejo del TCR y su función es participar en la traducción de señales y expresión en superficie del TCR (Fig. 3).

Después de la diferenciación y migración del timo a los órganos inmunes periféricos, las células Th CD4<sup>+</sup> son denominadas células Th0. Estas células son funcionalmente inmaduras y son capaces de secretar solo IL-2. La estimulación antigénica puede llevar a estas células a diferenciarse en dos subsets distintos llamados linfocitos Th1 y Th2. La activación y diferenciación de las células Th precursoras requiere al menos dos señales separadas. La primer señal deriva del TCR/CD3, luego de su interacción con el antígeno/CMH en la CPA. La segunda señal es producida por un número de moléculas co-estimuladoras o accesorias por ejemplo, CD28/B7, OX40 y LFA-1/ICAM (Fig. 3). El hecho de que una respuesta inmune sea dominada por células Th1 versus Th2 esta claramente influenciada por la naturaleza de estas dos señales. Sin embargo, ninguna de estas dos señales es un potente determinante de la diferenciación Th como es el entorno de citoquinas (Seder y Paul, 1994).



**Figura 3: Moléculas de superficie del linfocito Th y ligandos implicados en el reconocimiento del antígeno y en las respuestas de células T.** Las interacciones entre una célula T  $CD4^+$  y una CPA implican múltiples proteínas de superficie. CD4 es una molécula accesoria expresada selectivamente en los linfocitos Th que sirve como molécula de adhesión y tiene afinidad por moléculas CMHII en la superficie de la CPA, además puede transducir señales. El TCR proporciona a los linfocitos T la capacidad de reconocer antígenos unidos a las moléculas del CMH, pero tanto la expresión del TCR como sus funciones en la activación de las células T dependen de otras proteínas asociadas como las CD3. Las proteínas CD3 forman parte del complejo del TCR y su función es participar en la traducción de señales del TCR y expresión en superficie. La activación y diferenciación de las células Th requiere al menos dos señales separadas. La primera señal deriva del TCR/CD3, luego de su interacción con el antígeno/CMH en la CPA. La segunda señal es producida por un número de moléculas co-estimuladoras por ejemplo, CD28/B7, CD2/LFA-3 y LFA-1/ICAM

### *1.3.1. Células presentadoras de antígenos, antígenos, co-estimulación*

La primera señal proviene de la interacción del TCR de células Th nativas precursoras con el CMH/antígeno en la CPA como por ejemplo una célula dendrítica. La reciente fenotipificación de distintos subsets de células dendríticas ha revelado una función única para estos subsets en el desarrollo de células Th. En el ratón, las células dendríticas  $CD8\alpha^+$  producen IL-12 y estimulan preferencialmente la diferenciación del linaje Th1 (Maldonado-Lopez et al., 1999). Se ha demostrado que un factor secretado por células T denominado Eta1/osteopontina podría

influenciar la diferenciación al linaje Th1 por inducción de IL-12 e inhibición de la secreción de IL-10 en las CPA (Ashkar et al., 2000). Un segundo subset de células dendríticas CD8<sup>-</sup> influenciarían la diferenciación Th2 posiblemente por inducción de la producción de IL-6 (Rincon et al., 1997). Otra posibilidad es que quemoquinas específicas puedan polarizar células Th precursoras, como fue evidenciado por ratones deficientes en MCP-1 que no pueden montar respuestas Th2 (Gu et al., 2000). También es sabido que la estructura del antígeno y la dosis del antígeno influyen en la diferenciación Th (Constant y Bottomly, 1997). Existe un rol muy claro de las moléculas co-estimuladoras como CD28 y B7 en la diferenciación del linaje Th2. Ratones deficientes en CD28 y B7 tienen dificultad para montar respuestas Th2 (Green et al., 1994). El linaje Th2 es inducido diferencialmente por la señalización dependiente de CD28 mediada por OX40 (Akiba et al., 2000). Además, el bloqueo de la interacción entre LFA-1/ICAM-1,2 resulta en una sobreproducción de citoquinas Th2 (Salomon y Bluestone, 1998) demostrando la importancia de esta interacción.

### *1.3.2. Citoquinas*

El entorno de citoquinas en el momento en que se produce la respuesta inmune constituye uno de los factores más importantes para la diferenciación Th. Las dos citoquinas críticas que controlan la diferenciación Th1 y Th2 son respectivamente IL-12 e IL-4. Estas citoquinas son capaces de inducir la generación de su propio subset Th e inhibir simultáneamente la generación del subset opuesto (Maggi et al., 1992; Hsieh et al., 1993) (Fig. 1 y 2), eventos que ocurrirían en el estadio Th precursor ya que una vez establecidas las células Th1 y Th2 no pueden revertir su fenotipo (Murphy et al., 1996). El requerimiento de estas dos citoquinas ha sido demostrado por el fenotipo que desarrollan ratones deficientes en estas citoquinas, los receptores para estas citoquinas, o las moléculas efectoras río abajo de estos receptores. IL-12 secretada por la CPA, activa el camino de señalización vía STAT-4 y ratones deficientes en IL-12 o STAT-4 no tienen células Th1 (Kaplan et al., 1996). Otra citoquina que influencia la diferenciación Th1 es IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  activa el camino de señalización vía STAT-1. Ratones deficientes en STAT-1 tienen respuestas Th1 deficientes *in vivo* (Meraz et al., 1996). Al contrario, ratones deficientes en IL-4, el receptor de IL-4 o STAT-6, la molécula río abajo de la señalización del receptor de IL-4, no pueden desarrollar células Th2 en respuesta a la mayoría de los estímulos (Noben-Trauth et al., 1997).



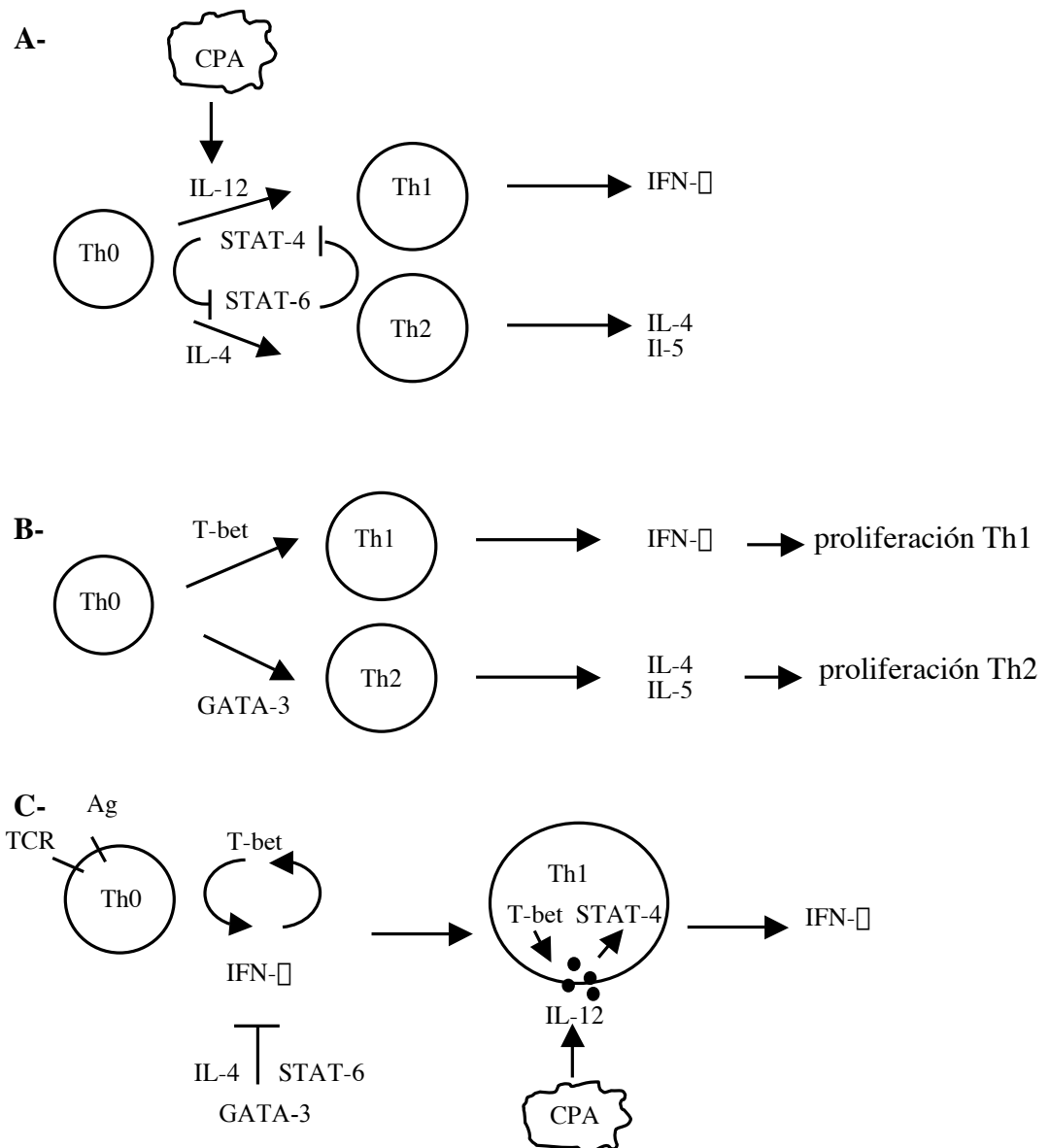
### *1.3.3. Diferentes modelos que intentan explicar la diferenciación del linfocito T helper*

Existen dos modelos que intentan explicar como las citoquinas influyen la diferenciación Th (Coffman y Reiner, 1999): un modelo “selectivo” que implica que las citoquinas seleccionan células que ya tienen definido un destino predeterminado, y un modelo “instructivo” en el cual las citoquinas inducen a las células T para que asuman un destino específico; estos dos modelos pueden co-existir. En el modelo instructivos (Fig. 4A) las citoquinas (IL-12 o IL-4) serían necesarias para causar el compromiso del linaje más que el crecimiento celular; y al contrario, en el modelo selectivo (Fig. 4B), el compromiso o destino precedería a la acción de las citoquinas, las cuales solamente actuarían para alterar el crecimiento celular (actuarían como factores de crecimiento) pero no cambiarían la expresión genética dentro de una línea clonal.

Actualmente se cree que existe una regulación mutua entre citoquinas y FT (Fig. 4C) (Ansel et al., 2003; Reiner et al., 2003). Las células Th0 expresarían algo de los FT T-bet (Th1) y GATA-3 (Th2) antes de entrar al ciclo celular. Luego, estos FT se autoinducirían e inducirían el remodelado de la cromatina de genes blanco (IL-4 para GATA-3 e IFN- $\gamma$  para T-bet) a medida que las células entran en la fase S. Las citoquinas IL-12 e IL-4 podrían a su vez reprimir la inducción de GATA-3 y T-bet respectivamente, pero la inhibición completa de estos FT “maestros” requiere de la replicación del DNA por lo que células parentales permanecerían pluripotentes y las citoquinas solamente podrían limitar pero no inhibir los destinos opuestos. Probablemente T-bet y GATA-3 a su vez, serían capaces de inducir o reprimir los caminos de señalización de las citoquinas.

De esta manera, los modelos selectivos e instructivos no son mutuamente excluyentes. Claramente tanto IL-12 como IL-4 proveen señales de proliferación a una amplia variedad de tipos celulares. Además, las señales vía STAT-4 y STAT-6 podrían servir funciones duales de diferenciación y crecimiento selectivo. Es muy probable que IL-4 e IL-12 actúen seleccionando células con un destino predeterminado (Murphy et al., 1994; Szabo et al., 2000), por lo tanto actuando como señales de crecimiento para células que ya han sido programadas por los reguladores “maestros” T-bet y GATA-3 (Reiner, 2001). Sin embargo existe evidencia a favor de un rol instructivo donde IL-4 e IL-12 son capaces de inducir la expresión de los reguladores “maestros” dirigiendo las células hacia un destino definido (Agarwal y Rao, 1998; Murphy et al., 2000; Reiner, 2001).

La regulación Th1/Th2 es muy compleja pero su importancia no es cuestionable, particularmente en el estudio de varias enfermedades como alergias y asma, así como también diabetes tipo 1 y otras enfermedades autoinmunes. Esta es una área amplia de investigación para el diseño de terapias inmunomodulatorias destinadas a disminuir respuestas exageradas o reforzar las débiles. Definir todos los mecanismos que controlan estos procesos, incluyendo los que hemos discutido, ayudarían a desarrollar terapias para manipular el balance Th1/Th2.

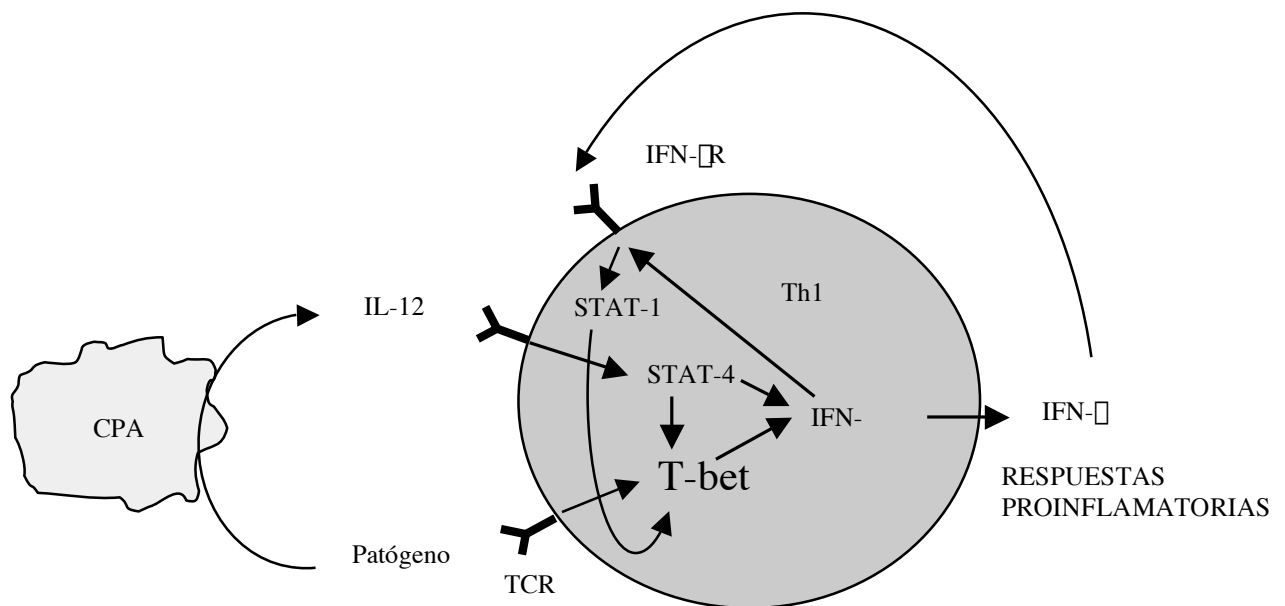


**Figura 4: Regulación del desarrollo Th.** (A) Modelo inicial que solo muestra la importancia de las citoquinas en la diferenciación Th (modelo instructivo). (B) Modelo surgido posteriormente que muestra la importancia del rol de FT específicos de linaje como T-bet y GATA-3 como los reguladores claves de la diferenciación (modelo selectivo). (C) Modelo actual que muestra que existiría una regulación mutua entre citoquinas y FT (solamente está ejemplificado para la diferenciación Th1).

## I.4. DESARROLLO DEL LINAJE T HELPER 1

### I.4.1. Rol de STAT-4 en la diferenciación T helper 1

Las señales que emanan tanto del TCR como del receptor de IL-12 dirigen la diferenciación Th1 ya que éstas inducen la expresión del FT Th1 específico T-bet (Fig. 5). Además, el desarrollo del linaje Th1 implica la señalización vía STAT-4 inducida por IL-12. La importancia de STAT-4 en el desarrollo del linaje Th1 fue comprobada utilizando ratones deficientes en STAT-4 (Kaplan et al., 1998). Resulta interesante que no toda la producción de IFN- $\gamma$  en las células T depende de STAT-4 como fue demostrado en células T deficientes en STAT-6/STAT-4 capaces de seguir produciendo IFN- $\gamma$  y también en células T CD8<sup>+</sup> que no dependen de STAT-4 para la producción de IFN- $\gamma$  inducida por el TCR. A pesar de que STAT-4 es importante para el desarrollo del linaje Th1, su rol directo en la producción de IFN- $\gamma$  no está claro.



**Figura 5: FT que controlan la diferenciación Th1.** IL-12 vía STAT-4 induce la expresión de T-bet en células Th1. Además el TCR también induce la diferenciación Th1. IFN- $\gamma$  vía STAT-1 también estaría implicado, induciendo la expresión de T-bet el cual remodelaría la cromatina de alelos individuales de IFN- $\gamma$  e induciría la expresión del receptor de IL-12 promoviendo la diferenciación Th1.

#### *1.4.2. Rol de IL-12*

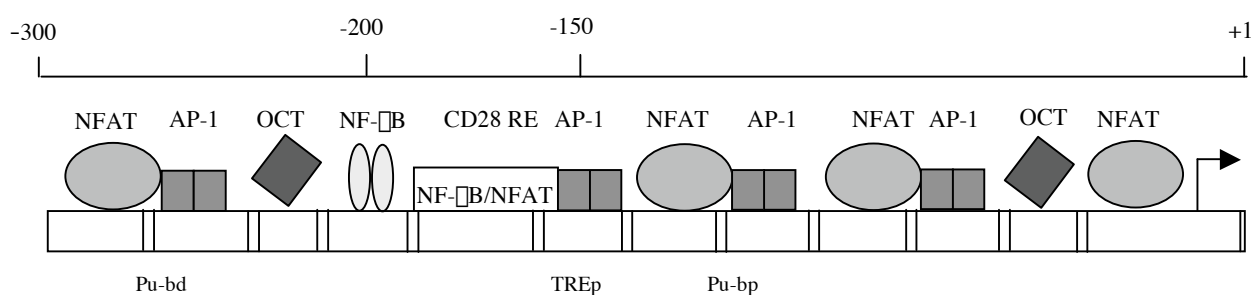
Durante la respuesta inmune innata contra patógenos microbianos, monocitos y macrófagos producen IL-12. IL-12 estimula a las células NK y linfocitos T $\gamma\delta$  así como también linfocitos T $\alpha\beta$  para producir IFN- $\gamma$ . Luego los macrófagos son nuevamente activados por IFN- $\gamma$  resultando en un aumento del clearance del organismo. La respuesta inmune adaptativa es inducida hacia las respuestas Th1 por IL-12. La respuesta de las células T a la IL-12 depende de la expresión del receptor de alta afinidad de IL-12 el cual consiste en las subunidades de cadenas beta 1 y beta 2. La subunidad beta 2 está involucrada en la señalización río abajo la cual incluye la activación de STAT-4. Ratones deficientes en STAT-4 no pueden desarrollar el linaje Th1 (Kaplan et al., 1996; Thierfelder et al., 1996). Es sabido que IL-12 es un factor clave que aumenta la expresión inducida por el TCR de la cadena beta 2 del receptor de IL-12 (Elloso y Scott, 2001). Además, durante el desarrollo Th2, las células T no responden a IL-12, por lo tanto no producen IFN- $\gamma$  ni fosforilan STAT-4 en respuesta a IL-12. IL-4 es responsable de la supresión de la expresión de la cadena beta 2 del receptor de IL-12 en células T humanas. En el ratón, GATA-3 inhibe la señalización de IL-12 inhibiendo la expresión de la cadena beta 2 del receptor de IL-12 y la expresión de este FT es aumentada por IL-4 e inhibida por IL-12 (Ouyang et al., 1998). El FT específico del linaje Th1, T-bet es inducido por IL-12. Durante la activación de células T, la expresión de T-bet es dependiente de la señalización vía IFN- $\gamma$  y la activación de STAT-1 pero es independiente de la vía IL-12/STAT-4. Además, T-bet media procesos STAT-1 dependientes en el desarrollo Th1, mediante la remodelación de la cromatina de alelos individuales de IFN- $\gamma$  y mediante la inducción de la cadena beta 2 del receptor de IL-12 (Afkarian et al., 2002). IL-12/STAT-4 sirven como señales de crecimiento, induciendo la sobrevivencia y la división celular y como transactivador, prolongando la síntesis de IFN- $\gamma$  a través de la interacción genética con el coactivador CREB (Mullen et al., 2001). Por otro lado, la re-estimulación de células Th2 totalmente polarizadas en presencia de IL-12 favorece el shift hacia los fenotipos Th0/Th1, con la supresión de GATA-3 y la inducción de T-bet, un aumento marcado de la expresión de la cadena beta 2 del receptor de IL-12 y una restauración de la activación inducible por IL-12 de STAT-4. Este shift es estable dado que re-estimulaciones sucesivas en presencia de IL-4 no pueden deshacer los cambios (Smits et al., 2001).

### I.4.3. Regulación transcripcional de las citoquinas T helper 1 específicas

#### I.4.3.1. IL-2

IL-2 es expresada exclusivamente en linfocitos T y es la citoquina que se produce más tempranamente durante la diferenciación Th. Es la citoquina mayoritaria producida por el linfocito Th precursor. Los linfocitos Th1 diferenciados y efectores y no los Th2, producen IL-2 pero en menores cantidades que el linfocito Th precursor. La unión al TCR activa a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y los caminos dependientes de  $Ca^{2+}$ , ambos esenciales para la expresión de IL-2, y llevan a la activación de varios FT incluyendo NFAT y AP-1. En las células T en reposo, las proteínas NFAT residen en el citoplasma en estado fosforilado. Durante la estimulación son rápidamente desfosforiladas por la fosfatasa calcineurina y translocadas al núcleo donde, en combinación con proteínas AP-1 activan la transcripción de múltiples genes de citoquinas, incluyendo IL-2 (Jain et al., 1995).

Existe una región mínima promotora/enhancer de 300 pb que es suficiente para la expresión tejido-específica del gen de IL-2 en células Th1 (Lederer et al., 1994). Esta región contiene sitios para el pegado de múltiples FT como NFAT, AP-1, NF- $\kappa$ B y factores constitutivos como las proteínas OCT (Maggirwar et al., 1997) (Fig. 6).

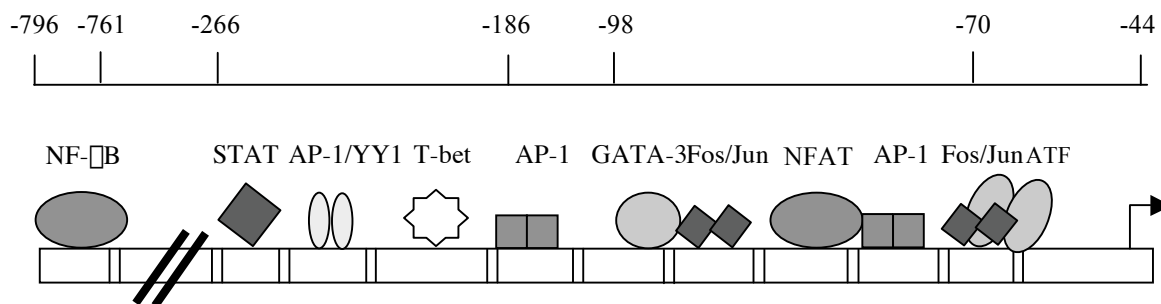


**Figura 6: Esquema de la región mínima promotora/enhancer de IL-2.** En este esquema se muestran el promotor de IL-2 y los principales FT involucrados en su regulación.

#### I.4.3.2. IFN- $\gamma$

Células Th1, CD8<sup>+</sup> y NK son los secretores mayoritarios de IFN- $\gamma$  el cual es inducido a las 24 hs luego de la estimulación de células nativas. Existen dos elementos regulatorios esenciales en

el promotor proximal, entre -108 y -40 pb, siendo el elemento distal (-96 a -80) un motivo consenso GATA que une GATA-3 *in vitro* y el elemento regulatorio proximal (-73 a -48) capaz de unir CREB, ATF-1, ATF-2, c-Jun y proteínas Oct-1 (Penix et al., 1996). El elemento proximal es inhibible por ciclosporina A. Existen sitios NFAT por fuera del elemento regulatorio proximal y proteínas NFAT que transactivan e interactúan con estos sitios *in vitro*. NF- $\kappa$ B y posiblemente NFAT se unen y transactivan regiones en el primer intron del gen de IFN- $\gamma$  (Sica et al., 1997). La proteína Ying-Yang 1 (YY1) transactiva IFN- $\gamma$  a través de la unión a un elemento comprendido entre dos sitios NFAT (Ye et al., 1996). Además, T-bet también induce la actividad del promotor de IFN- $\gamma$  (Szabo et al., 2000) (Fig. 7).



**Figura 7: Esquema del promotor de IFN- $\gamma$ .** En este esquema se muestran el promotor de IFN- $\gamma$  y los principales FT involucrados en su regulación.

#### *1.4.4. T-bet, un factor de transcripción que controla la transcripción de IFN- $\gamma$ y la diferenciación del linaje T helper 1*

En busca de los programas genéticos que controlan la diferenciación Th, varios laboratorios intentaron aislar factores que dieran cuenta de la expresión selectiva de IFN- $\gamma$  e IL-4 de subsets Th, suponiendo que dichos factores serían importantes para determinar el destino del linaje. Esta búsqueda resultó en el aislamiento de un FT, T-bet que es un factor específico del linaje Th1 y que controla la transcripción del gen de IFN- $\gamma$  y un FT Th2 específico GATA-3 que controla la transcripción de IL-4 e IL-5 y que se discutirá más adelante.

Se había especulado que el FT cuya pérdida podría resultar en una incapacidad de generar una respuesta Th1 y producción de IFN- $\gamma$  era STAT-4, pero este FT no es específico del linaje Th1. A pesar que STAT-4 es importante para la diferenciación Th1 a partir de células Th precursoras nativas, parece no ser requerido en células Th1 ya diferenciadas.

T-bet fue aislado usando un reportero del promotor de IL-2 y una librería de DNAC preparada a partir de células Th1 activadas mediante un screening en levaduras simple híbrido. Varios clones independientes obtenidos codificaban para el mismo gen, un nuevo miembro de la familia T-box de FT. El gen fue nombrado T-bet (Szabo et al., 2000). La familia T-box es definida por la presencia de dominios de unión al DNA T-box altamente conservados. Existen varios sitios de unión T-box en el promotor de IL-2 y en el promotor y tercer intron del gen de IFN- $\gamma$  donde el sitio Th1 específico de hipersensibilidad a la DNAsa I se encuentra localizado.

T-bet es expresado solamente en células Th1 y NK los conocidos productores de IFN- $\gamma$  (Szabo et al., 2000). En estas células, los transcritos de T-bet se relacionan con la expresión de IFN- $\gamma$  en todas las células examinadas incluyendo células B que pueden ser inducidas a producir T-bet e IFN- $\gamma$  cuando son estimuladas vía el receptor CD40 en presencia de IL-12 e IL-18. Ensayos de transfección transiente en un linfoma Th0 no productor de IFN- $\gamma$  (la línea celular EL-4), revelaron que T-bet es un potente transactivador del gen de IFN- $\gamma$  y represor del gen de IL-2 (Szabo et al., 2000). La presencia de T-bet en éstas células indujo la producción endógena de IFN- $\gamma$ . Para investigar el efecto de T-bet en células T primarias, células T CD4<sup>+</sup> fueron transducidas retroviralmente con una construcción bisistrónica T-bet/GFP. La función de T-bet fue determinada en células T CD4<sup>+</sup> sin diferenciar, en células Th2 en desarrollo, y en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> totalmente polarizadas. En todos los casos la presencia de T-bet resultó en la generación de un gran número de células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  que expresaban marcadores del linaje Th1. T-bet no solo indujo la producción de IFN- $\gamma$  sino también simultáneamente produjo el apagado de la producción de citoquinas Th2 IL-4 e IL-5 (Szabo et al., 2000). La expresión de IL-2 también fue reducida, consistente con un rol de T-bet en dirigir la diferenciación. Estos efectos fueron observados en células Th2 en desarrollo temprano pero también en células Th2 totalmente diferenciadas.

Ratones homocigotas para la delección de T-bet (T-bet  $-/-$ ), mostraron una disminución en la producción de IFN- $\gamma$  en células T CD4<sup>+</sup> aún en presencia de IL-12 (Szabo et al., 2002). En condiciones neutrales las células CD4<sup>+</sup> T-bet  $-/-$  produjeron una disminución de la producción de IFN- $\gamma$  pero hubo un aumento en la producción de citoquinas Th2, IL-4 e IL-5. Aún cuando fueron estimuladas bajo condiciones Th1, éstas células continuaron produciendo bajos niveles de IFN- $\gamma$  y fueron incapaces de suprimir la producción de IL-4 e IL-5. En ausencia de T-bet,

las células T CD4<sup>+</sup> fallan en la diferenciación hacia el linaje Th1 y terminan diferenciándose al linaje Th2. Además se vio que ratones deficientes en T-bet tienen un desarrollo linfocitario normal pero tienen un profundo defecto en montar respuestas Th1 y un aumento en la producción de citoquinas Th2 (Neurath et al., 2002).

La función de T-bet fue ensayada en varios modelos de enfermedad en animales y humanos. La ausencia de T-bet es protectora en modelos animales para la enfermedad de Bowel (enfermedad del tracto gastrointestinal asociada al linaje Th1) indicando que T-bet estaría asociada a la patogenia de esta enfermedad inflamatoria (Weigmann y Neurath, 2002). Ratones deficientes en T-bet desarrollan hiperrespuestas aéreas, inflamación de las vías aéreas y remodelado epitelial en estas vías, todas características de asma agudo y crónico en humanos, y estas características pueden ser transferidas utilizando células Th deficientes en T-bet (Finotto et al., 2002).

La expresión ectópica de T-bet induce la producción de IFN- $\gamma$  en células deficientes en STAT-4 aún cuando las células son cultivadas en presencia de IL-4 y el anticuerpo anti-IL-12 (condiciones diferenciadoras Th2). Además, en ausencia de la señalización vía IL-12/STAT-4, T-bet puede aumentar la expresión de la cadena beta 2 del receptor de IL-12, inducir la expresión endógena de T-bet y producir el remodelado de la cromatina en alelos individuales del gen de IFN- $\gamma$  (Mullen et al., 2001). T-bet induce la accesibilidad de la cromatina en el gen de IFN- $\gamma$  y estabiliza la capacidad de STAT-4 de reclutar histonas-acetiltransferasas (HAT), proteínas CREB, potenciando la expresión del gen. Por lo tanto, parece que T-bet estaría actuando antes y de manera independiente a la activación vía IL-12 y STAT-4 en la diferenciación Th1. Además, parecería ser que el aumento del RNAm de T-bet asociado a IL-12 durante el compromiso estocástico del linaje Th1 podría simplemente reflejar una ventaja de sobrevivencia para las células que ya estarían expresando T-bet, más que un efecto directo sobre la diferenciación misma (Mullen et al., 2001). Por lo tanto, T-bet es un regulador clave para la diferenciación Th1 y lleva a cabo esta función mediante la activación de los programas genéticos inductores Th1 y produciendo el apagado de los programas genéticos inductores Th2.

Recientemente se demostró que durante la activación T, la expresión de T-bet es altamente dependiente de la señalización vía IFN- $\gamma$  y la activación de STAT-1, pero sería independiente de STAT-4 (Lighvani et al., 2001; Afkarian et al., 2002). La expresión ectópica de T-bet



induce selectivamente la expresión de la cadena beta 2 del receptor de IL-12 en células Th2 salvajes y deficientes en STAT-1, pero no puede inhibir la expresión de GATA-3 y citoquinas Th2. Además, la expresión ectópica de T-bet no puede inducir la expresión endógena de T-bet de manera independiente de IFN- $\gamma$  o STAT-1. Por lo que IFN- $\gamma$  y T-bet podrían estar conformando un loop de amplificación. Tomando en cuenta toda esta data, surge un nuevo modelo para intentar explicar la regulación de la diferenciación Th1 (O'Shea y Paul, 2002). Las células T CD4<sup>+</sup> nativas expresan bajos niveles de STAT-4, cadena beta 2 del receptor de IL-12, T-bet y no responden a IL-12. Cuando se activa la señalización vía el TCR se podría inducir T-bet e IFN- $\gamma$  y sinergizar con la señalización del TCR para producir máximas cantidades de T-bet en un proceso dependiente de STAT-1 pero independiente de IL-12 y STAT-4. Luego T-bet regularía la respuesta a IL-12 vía sus efectos en la expresión de la cadena beta del receptor de IL-12. Parecería que T-bet e IFN- $\gamma$  no son suficientes para permitir el desarrollo completo del linaje Th1. Mas bien, la activación aumenta la expresión del receptor de IL-12 y STAT-4 y la señalización de IL-12 vía STAT-4 permanecen como esenciales para la óptima diferenciación Th1. T-bet preservaría la expresión de la cadena beta 2 del receptor de IL-12 y proveería de resistencia a IL-4 probablemente inhibiendo la expresión de receptor. Estos resultados ubicarían a T-bet río arriba de IL-12 y STAT-4. Finalmente las células que expresan T-bet muestran un aumento en la proliferación, sugiriendo un modelo potencial de inducción del crecimiento selectivo para el desarrollo Th1 inducido por T-bet.

T-bet es blanco de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo es fosforilado en residuos de tirosina por la ITK quinasa. Esta fosforilación es necesaria para la inhibición de la expresión de citoquinas Th2 mediada por T-bet pero no afecta la producción de IFN- $\gamma$ . Esta inhibición estaría mediada por la asociación física entre T-bet y GATA-3. La fosforilación de T-bet sería necesaria para la represión de los programas genéticos Th2 más que para la inducción de los programas Th1, lo cual demostraría que las dos principales funciones de T-bet en la dirección del linaje Th, la activación y la represión de genes, serían mecanismos distintos (Hwang et al., 2005b).

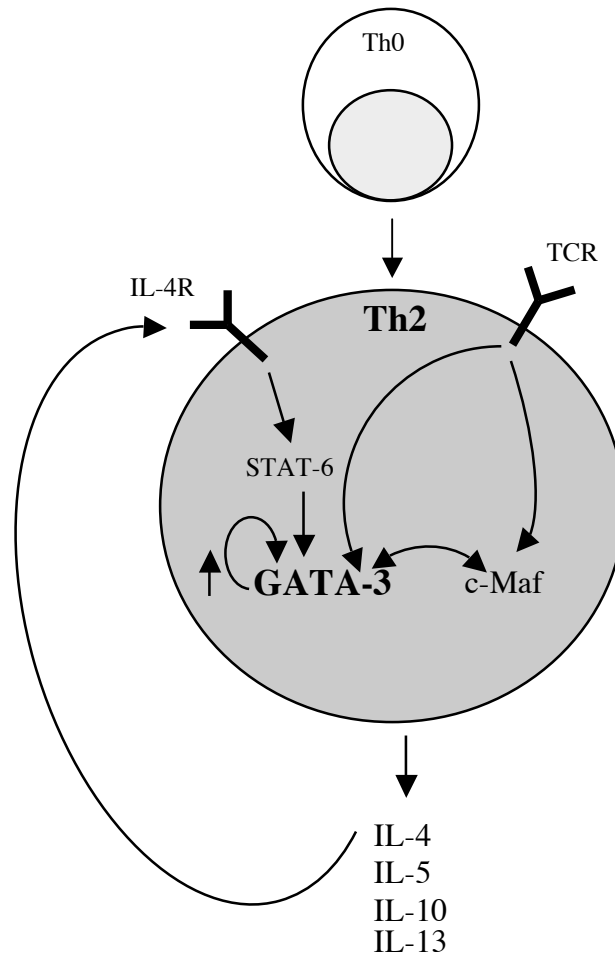
## I.5. DESARROLLO DEL LINAJE T HELPER 2

### I.5.1. Caminos de señalización

Existen dos caminos de señalización principales que dirigen la diferenciación Th2: el TCR y el receptor de IL-4 (Fig. 8). Las señales que emanan del TCR activan a dos FT Th2 específicos GATA-3 y c-Maf, y también regulan la expresión y activación de los FT pleiotrópicos, NFAT y AP-1. Durante la señalización vía el receptor de IL-4, se necesita que STAT-6 se una al dominio citoplasmático del receptor de IL-4 donde es fosforilado por quinasas, llevando a la dimerización de STAT-6 y traslocación al núcleo. A pesar de ser muy poco probable que STAT-6 por sí solo controle la transcripción del gen de IL-4 (Lederer et al., 1996), activa un número de genes blanco de IL-4 como por ejemplo la transcripción del gen de IgE, CMH clase II, receptor de IL-4, CD23 y de GATA-3 (Ouyang et al., 1998). La expresión ectópica de STAT-6 en células Th1 en desarrollo induce la expresión de GATA-3 y c-Maf con la subsiguiente expresión de IL-4 (Kurata et al., 1999).

Existen caminos de diferenciación Th2 independientes de STAT-6, por ejemplo vía BCL-6. Ratones que carecen de BCL-6 (un represor transcripcional que inhibe la actividad de STAT-6 por competición por los sitios de unión de STAT-6) tienen alteraciones profundas en el fenotipo Th2 (Dent et al., 1997). A pesar de esto, aunque existen vías de producción de IL-4 independientes de STAT-6, no existen dudas del importante rol de este FT en generar la diferenciación Th2 *in vivo* como fue evidenciado por el fenotipo de ratones deficientes en STAT-6 (Shimoda et al., 1996).

IL-4 e IL-5 son las principales citoquinas implicadas en la diferenciación Th2. Ambas son estrictamente reguladas por GATA-3 y tienen sitios de pegado para este FT en sus sitios reguladores o promotores. Además, son frecuentemente utilizadas como citoquinas marcadoras del fenotipo Th2 en variedad de trabajos relacionados con el tema. Es por ello que a continuación nos concentramos en detallar la regulación de los promotores de estas dos citoquinas.



**Figura 8: FT que controlan la diferenciación Th2.** IL-4 vía STAT-6 induce la expresión de GATA-3 en células Th2. Además las señales que emanan del TCR también inducen la expresión de GATA-3 y c-Maf. A su vez, GATA-3 sería capaz de autoinducirse y controlar la expresión génica de citoquinas Th2 claves como por ejemplo IL-4/IL-13 e IL-5.

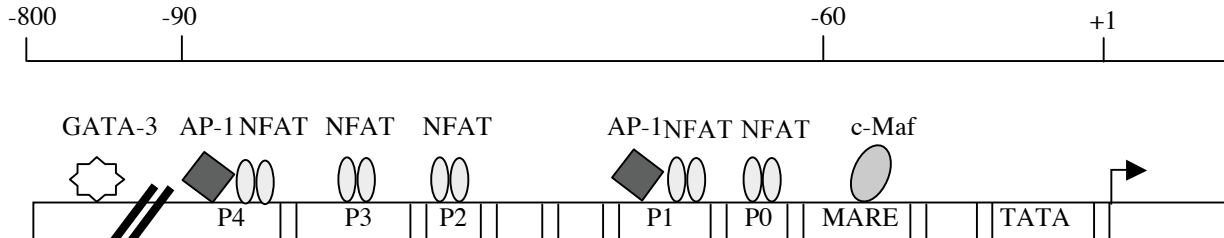
### *1.5.2.Regulación transcripcional de citoquinas T helper 2 específicas*

#### *1.5.2.1. IL-4*

La expresión de IL-4 esta restringida al subset Th2, CD8<sup>+</sup>, NK, mastocitos, basófilos y eosinófilos. Las células T precursoras nativas expresan el RNAm de IL-4 a las 24 hs luego de la estimulación vía el TCR y los niveles aumentan a las 48 hs. Una región de 3 kb del promotor de IL-4 confiere expresión que mimetiza la expresión endógena de IL-4. La región entre -741 a +60 pb es preferencialmente expresada en células Th2. Un trímero de la región que abarca un

sitio NFAT/AP-1 (-88 a -60) es moderadamente Th2 específico (Wenner et al., 1997). Además existen elementos enhancers por fuera del promotor de IL-4 que confieren altos niveles de expresión de IL-4 endógenos que son regulados por GATA-3 (Fig. 9).

La actividad del promotor de IL-4 es inducible por anti-CD3, ésteres de forbol e ionóforos de  $Ca^{2+}$ , e inhibible por ciclosporina A. Existen cinco sitios NFAT, dos de los cuales son sitios compuestos NFAT/AP-1 dentro del promotor proximal que son críticos para la expresión inducible de IL-4 (Chuvpilo et al., 1993; Brown y Hural, 1997). A pesar que las familias de proteínas NFAT y AP-1 no pueden explicar la especificidad Th2 de la expresión del gen de IL-4, el fenotipo de los ratones que carecen de NFAT ha revelado un rol importante para esta familia en el control de la expresión de los genes de citoquinas, en especial de citoquinas Th2 (Ranger et al., 1998). Algunos miembros de la familia de FT NFAT actuarían en conjunto con el FT Th2 específico GATA-3 para dirigir la transcripción del gen de IL-4 y también de IL-5 (Zheng y Flavell, 1997; Wang et al., 2006a; Wang et al., 2006b). Además c-Maf se uniría a sus sitios consenso (MARE) en el promotor proximal de IL-4 (Ho et al., 1996).

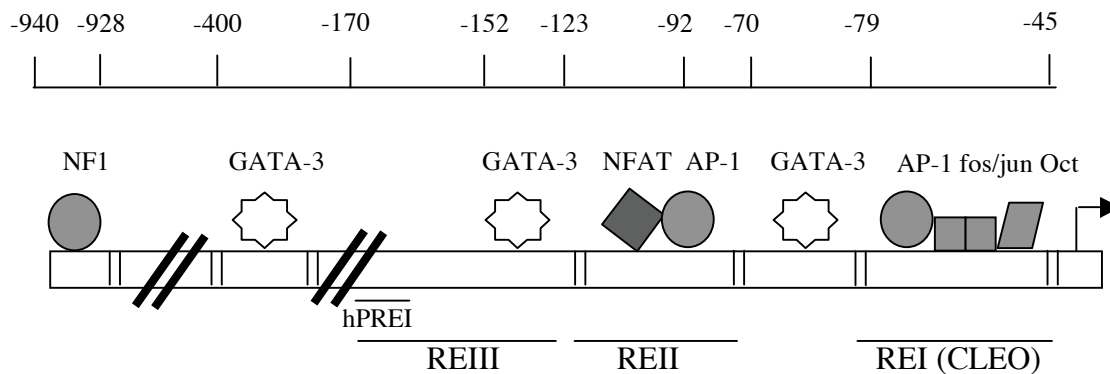


**Figura 9: Esquema del promotor/enhancer de IL-4.** En este esquema se muestran el promotor de IL-4 y los principales FT involucrados en su regulación.

#### 1.5.2.2. IL-5

IL-5 es producida por eosinófilos, mastocitos, células epiteliales y en células Th2 la cual es la fuente mayoritaria. IL-5 estimula el crecimiento y la diferenciación de los eosinófilos y activa eosinófilos maduros, los cuales son capaces de eliminar helmintos. Los eosinófilos tienen receptores para IgE la cual está recubriendo microbios. Además, la IL-4 estimula linfocitos B para producir IgE, la cual a su vez opsoniza helmintos y une eosinófilos. De esta forma IL-4 e IL-5 actúan juntas para destruir microorganismos extracelulares. IL-5 también estimula la

proliferación de células B y la producción de IgA. Existen cuatro elementos regulatorios en el promotor de IL-5 que son importantes para su actividad completa: IL-5A (-948 a -933), IL-5P (-117 a -92), IL-5C (-74 a -56), IL-5CLE0 (-55 a -38) (Fig. 10). IL-5P parece tener homología con los sitios de unión de NFAT. Un factor relacionado con NFAT está involucrado en la regulación de este gen (Lee et al., 1995). Existen tres regiones en el promotor de IL-5 humano que están involucradas en la regulación de la expresión de IL-5REI (-79 a -45), REII (-123 a -92) y REIII (-170 a -130). El sitio REI no funciona como un elemento regulatorio inducible, en cambio parece actuar de manera constitutiva. Este sitio incluye el elemento conservado CLE0 (elemento linfocitario conservado 0), el cual actúa constitutivamente en células T estimuladas y sin estimular. Entre los miembros de la familia AP-1, JunD y Fos, así como también Oct-1 y Oct-2 (Mori et al., 1997a; Thomas et al., 1999). El sitio REII es crítico para la actividad inducible del promotor de IL-5, es inhibible por ciclosporina A y mutantes en este sitio muestran una disminución en la actividad del gen reportero, y por lo menos un miembro de la familia NFAT-1 y AP-1 de FT se une a este sitio (Stranick et al., 1997; De Boer et al., 1999). También existen dos elementos represores hPRE1 y hPRE2 en los promotores proximales y distales respectivamente. Existen tres sitios de unión para GATA-3 en el promotor de IL-5 humano: a -70, -152 y -400. El sitio de -70 y -152, regulan positivamente la transcripción de IL-5. Pero el sitio localizado a -400 actúa como un represor de la transcripción de IL-5. En células T humanas no estimuladas Oct-1 se une a CLE0, mientras que la estimulación induce la síntesis de novo de Jun D y Fra-2 miembros de la familia AP-1, los cuales se unen a CLE0. La cantidad de IL-5 producida se correlaciona con la producción del complejo AP-1. A pesar que la formación del complejo de AP-1 es esencial, el paso limitante es la síntesis de AP-1. La activación específica de IL-5 humana depende en parte del complejo AP-1 (Schwenger et al., 2002). El tratamiento de células Th con compuestos que elevan la cantidad de AMPc aumentan la expresión de citoquinas Th2, especialmente de IL-5. Este efecto sería mediado vía PKA, fosfo-p38 MAP quinasa (p-p38 MAPK) y fosforilación de GATA-3 (Chen et al., 2000a; Klein-Hessling et al., 2003).



**Figura 10: Esquema del promotor de IL-5.** En este esquema se muestran el promotor de IL-5 y los principales FT involucrados en su regulación.

### 1.5.3. Factores de transcripción *T helper 2* específicos

Se ha progresado mucho en la identificación de los FT responsables de la expresión tejida específica del gen de IL-4 en células Th2. Se han identificado dos FT Th2 específicos, el protooncogen *c-Maf* y el factor zinc finger (dedos de zinc) GATA-3. Existen otros FT como STAT-6, NFAT y AP-1 que no son específicos del linaje Th2 que también ayudarían a regular la producción de IL-4 e IL-5.

Un modelo generalizado podría ser que las señales que provienen del TCR activan tanto a *c-Maf* como GATA-3, mientras que las señales provenientes de la señalización vía IL-4 solamente inducen a GATA-3 y STAT-6. GATA-3 sería autoregulatoria y también es posible que GATA-3 y *c-Maf* se regulen mutuamente en un loop autocrino resultando en la producción de IL-4. GATA-3 inhibe la expresión del receptor de IL-12 y la producción de IFN- $\gamma$  por lo que inhibe a su vez la diferenciación Th1 por lo que se lo considera el FT clave en la diferenciación Th2 (Ho et al., 1998; Ouyang et al., 2000) (Fig. 8).

#### 1.5.3.1. *c-Maf*

Fue aislado utilizando un screening doble híbrido utilizando NFATc1 y una librería de DNAc de células Th2 activadas (Ho et al., 1996). *c-Maf* es el homólogo celular del oncogen viral aviario *v-maf* y es un miembro de la familia AP-1 de factores y se une a un sitio consenso

(MARE) en el promotor proximal de IL-4. La expresión de c-Maf se halla limitada a las células Th2 y su propia expresión es inducida por señales transmitidas vía el TCR. La expresión ectópica de c-Maf en todas las células testeadas incluyendo levaduras activa el promotor de IL-4. En líneas celulares T CD4<sup>+</sup> extraída de pacientes asmáticos, c-Maf se expresa en niveles muy altos en los clones Th2 pero en niveles mínimos en clones Th0 que producen IFN- $\gamma$  y muy poco IL-4. Se obtuvo evidencia extremadamente fuerte a partir de ratones transgénicos sobreexpresores de c-Maf (Ho et al., 1998) y de manera sumamente convincente a partir de ratones que carecen de c-Maf (Kim et al., 1999). Ratones transgénicos para c-Maf tienen aumentada las respuestas inmunes Th2 *in vivo* e *in vitro* (Ho et al., 1998). La delección del locus para c-Maf reveló una importante disminución en la producción de IL-4 en ausencia de c-Maf (Kim et al., 1999). Estos datos proveen evidencia muy fuerte que se requiere de c-Maf para la producción de IL-4 *in vivo*. Sin embargo el suministro de c-Maf en células Th1 efectoras maduras no les permite producir IL-4, sugiriendo que otro factor como GATA-3 sería necesario para inducir la diferenciación Th2.

#### 1.5.3.2. GATA-3

La proteína dedos de zinc GATA-3, fue inicialmente clonada como un FT específico de células T que se une a los elementos Ta3 del enhancer del gen de la cadena alfa del TCR (Ho et al., 1991). La delección del gen de GATA-3 produce anormalidades letales del sistema nervioso central y hematopoyético, mientras que ratones que carecen de GATA-3 en el sistema linfóide no generan células T porque los timocitos deficientes en GATA-3 quedan arrestados en el estadio inmaduro doble negativo. Un descubrimiento clave fue la expresión selectiva de GATA-3 en células Th2 (Zhang et al., 1997a; Zheng y Flavell, 1997). La expresión ectópica de GATA-3 lleva a un aumento de los niveles de citoquinas Th2, mientras que un transgen dominante negativo de GATA-3 inhibe la diferenciación Th2 (Zhang et al., 1999). GATA-3 controla directamente la expresión del gen de IL-5 a través de la unión y la transactivación de elementos en la región -70 a -59. GATA-3 no se une ni transactiva directamente al promotor de IL-4, existirían varias regiones genómicas dentro del locus IL-4/IL-13 que tienen elementos enhancers cuya actividad depende de GATA-3 (Ouyang et al., 1998). Por lo tanto, GATA-3 aumenta la expresión de IL-4 o IL-13 vía interacciones en sitios distales del promotor proximal.

Sumado al incremento de la expresión de citoquinas Th2 selectivas, GATA-3 inhibe el desarrollo Th1 de manera independiente de IL-4, en parte mediante la inhibición de la expresión de la cadena beta2 del receptor de IL-12 (Ouyang et al., 1998). A pesar que GATA-3 es un gen inducible por STAT-6, el programa de desarrollo iniciado por GATA-3 puede operar independientemente de STAT-6 (Ouyang et al., 2000). Cuando GATA-3 es expresado mediante retrovirus en células T deficientes en STAT-6, se observan todos los componentes del desarrollo Th2, incluyendo inducción de citoquinas Th2, inhibición de citoquinas Th1 y la formación de sitios de hipersensibilidad a la DNAsa I en el locus de IL-4 e IL-13 (Takemoto et al., 1998; Loots et al., 2000). GATA-3 actúa directamente y aumenta la actividad enhancer de ciertas regiones genómicas cerca de los genes de IL-4 e IL-13 en cooperación con el promotor de IL-4 (Ranganath et al., 1998; Lee et al., 2001), sugiriendo que estos sitios podrían representar los lugares donde GATA-3 actuaría para empezar el proceso general de activación del cluster de citoquinas Th2 para la expresión Th2 específica. Además, se observa la inducción del gen de GATA-3 endógeno, a pesar del agregado de IL-12, normalmente una señal que inhibe la expresión de GATA-3 (Ouyang et al., 1998). Esto sugiere la existencia de un camino de autoactivación de GATA-3 el cual provee un mecanismo para la adquisición de la independencia de IL-4/STAT-6 para el desarrollo Th2 (Ouyang et al., 2000).

La importancia de este camino independiente de STAT-6 se hace evidente en dos estudios. Uno muestra que las células Th2 pueden desarrollarse tanto *in vivo* en respuesta a la infección por *S. mansoni* aún en células que carecen de STAT-6 o el receptor de IL-4, sugiriendo la existencia de un camino estabilizador del desarrollo Th2 una vez que estas células han emergido (Jankovic et al., 2000). El otro muestra que en la respuesta primaria a los patógenos, ratones deficientes en STAT-6 generan respuestas IL-4 nativas, delineando un requerimiento de STAT-6 solamente en las respuestas secundarias (Finkelman et al., 2000). Estos hallazgos son consistentes con un modelo en el cual la expresión inicial de GATA-3 puede ser independiente de la activación de IL-4 y STAT-6, pero es reprimible por IL-12, en ausencia de dicha represión, GATA-3 puede ser inducida a través de la autoactivación independiente de STAT-6 para inducir el desarrollo del fenotipo Th2.

Un modelo generalizado podría ser que las señales que emanan del TCR activan a GATA-3, mientras que la señalización vía IL-4 induce la actividad de GATA-3 y STAT-6. A su vez, la actividad de GATA-3 es autoregulatoria (Glimcher y Murphy, 2000) e induce la producción de IL-4/IL-5. Al mismo tiempo, GATA-3 inhibe la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-



12, e inhibe la producción de IFN- $\gamma$  en células Th precursoras por lo tanto inhiben el camino Th1.

Existen fuertes evidencias que IL-4 vía STAT-6 eleva la transcripción de GATA-3 y que luego de la elevación transiente más allá de determinados niveles, ocurre la autoactivación de GATA-3, estabilizando su propia expresión y activando el cluster de citoquinas Th2, probablemente por interacción con determinados sitios, aumentando la accesibilidad del promotor a determinados FT. Como GATA-3 no parece actuar aumentando de manera selectiva el crecimiento celular, puede decirse que ejerce efectos instructivos. Sin embargo, aún podría haber mecanismos dependientes de STAT-6 no relacionados con GATA-3 que ejercen efectos en el crecimiento celular, permitiendo a IL-4 y STAT-6 tener efectos combinados instructivos y selectivos.

GATA-3 existe como una fosfoproteína en células no estimuladas. El tratamiento con AMPc induciría la fosforilación de GATA-3 vía p38 MAPK y estimularía la actividad de promotores dependientes de GATA-3. Este parecería ser un evento Th2 selectivo ya que AMPc apenas aumenta la actividad de p38 MAPK en células Th1 (Chen et al., 2000a). Se ha demostrado que el tratamiento de células Th con compuestos que elevan los niveles de AMPc, aumenta la expresión de citoquinas Th2, en particular la síntesis de IL-5, y que la activación de la proteína quinasa A (PKA) en células Th efectoras induce la expresión de IL-5 de manera GATA-3 dependiente (Klein-Hessling et al., 2003). Por lo tanto, diferencias en los caminos de señalización activados durante la activación T, y los posibles cambios post-traduccionales implicados estarían también involucrados en la modulación del fenotipo Th.

## **I.6. GLUCOCORTICOIDES**

### *I.6.1. Glucocorticoides naturales*

Los esteroides son un grupo de pequeños compuestos lipofílicos derivados de un precursor común, el colesterol. Los cuatro tipos mayoritarios de esteroides son la progesterona, los andrógenos, estrógenos y corticoides, los cuales difieren en el número de átomos de carbono que contienen, los receptores a los cuales se unen y las acciones biológicas que desarrollan. Los corticoides pueden ser divididos en dos grupos: los mineralocorticoides, los cuales regulan transporte de iones y los GC, los cuales tienen varias actividades incluyendo resistencia al

estrés, y actuando sobre crecimiento, función cardiovascular, equilibrio hidroelectrolítico, metabolismo, sistema inmune, reproducción, conducta y memoria y aprendizaje. Además de su rol fisiológico, ha sido involucrado en la fisiopatología de una variedad de trastornos.

El primer paso limitante en la biosíntesis de esteroides es el clivaje de la cadena lateral del colesterol por la enzima P450<sub>scc</sub> para generar el esteroide pregnenolona. La expresión de P450<sub>scc</sub> está limitada a los tejidos esteroideogénicos como las adrenales, placenta, gónadas, cerebro y timo. Pregnenolona es hidroxilada por la enzima P450<sub>c17</sub>, dando lugar a dos caminos posibles de síntesis de corticoides. En los roedores adultos la expresión de P450<sub>c17</sub> no es detectable en la corteza adrenal por lo que el GC circulante mayoritario en ratón es la corticosterona la cual difiere apenas del GC mayoritario circulante en la mayoría de las especies, incluyendo en humanos, el cortisol. La progesterona es hidroxilada para dar lugar a la 11-deoxicorticosterona, la cual tiene poca actividad de GC y es luego convertida en la mitocondria al GC activo, corticosterona (o cortisol).

Una característica importante de las respuestas inmunes o inflamatorias es el marcado aumento en la síntesis de citoquinas. Estas citoquinas activan el eje hipotálamo-pituitario-adrenal, causando un incremento de los niveles sistémicos de GC (Besedovsky et al., 1975). Los GC participan activamente en la interacción entre el sistema neuroendócrino con el componente celular del sistema inmune (Besedovsky y Sorkin, 1977). La meta de esta interacción regulatoria es asegurar una fina regulación destinada a mantener la homeostasis de todo el cuerpo evitando los efectos excesivos deletéreos inflamatorios/inmunológicos. Dentro de esta compleja red de comunicación, los GC y las citoquinas tienen un rol predominante en coordinar una respuesta inmune efectiva contra infecciones pero evadiendo una excesiva destrucción e inflamación (Besedovsky y del Rey, 1992). Los GC inhiben la expresión de los genes de citoquinas y su acciones pleiotrópica en las células blanco, actuando como agentes inmuosupresivos y antiinflamatorios destinados a contener las sobrerreacciones del sistema inmune, así como también las respuestas autoagresivas (Ashwell et al., 2000; Sapolsky et al., 2000).

Cuando ocurren cambios ambientales como estados infecciosos, los organismos necesitan desarrollar una respuesta biológica adaptativa adecuada. A través de las citoquinas, las células reciben información acerca de la calidad y la magnitud de la agresión. Mientras tanto, las hormonas dan información acerca de los cambios sufridos por diferentes sistemas como resultado de las alteraciones ambientales. Por lo tanto, las citoquinas y las hormonas actúan

como mensajeros que mandan información sistémica a todos los efectores celulares. El desenlace final de una respuesta adaptativa dependerá de que exista una integración satisfactoria de esta información a nivel intracelular, lo cual ocurre a través de la interacción molecular entre las señales que emanan de las citoquinas y vía el receptor esteroideo.

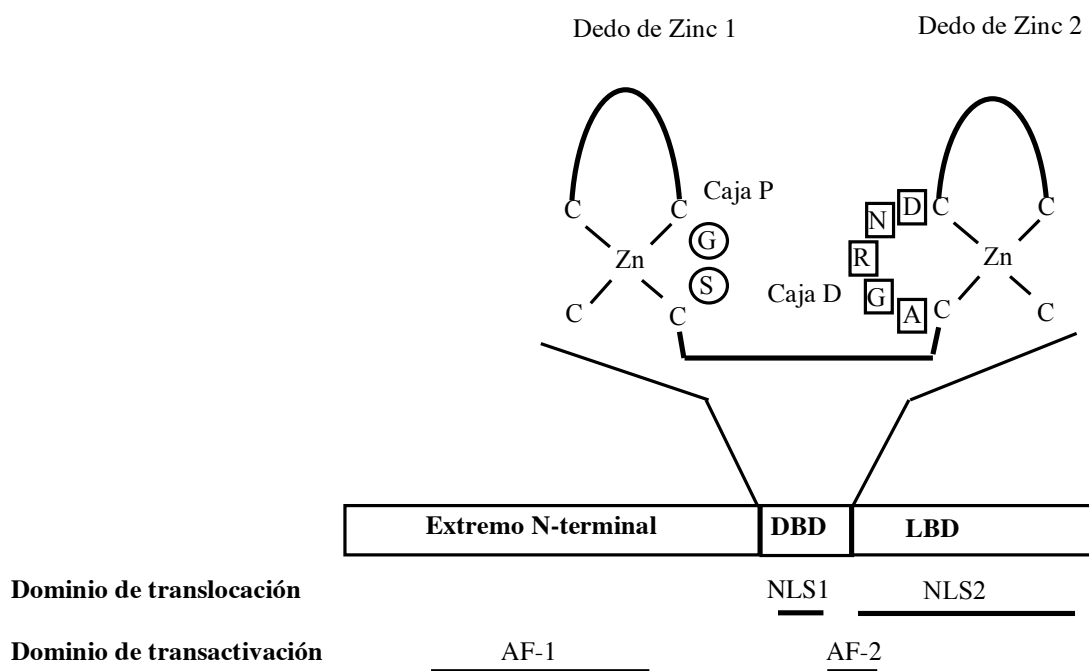
### *1.6.2. Glucocorticoides sintéticos*

Debido a la importante acción inmunosupresora y antiinflamatoria, la industria farmacológica ha desarrollado un número de análogos sintéticos de GC como son la dexametasona (Dex), betametasona, triamsinolona, prednisona, prednisolona y metilprednisolona entre muchas otras. Estos análogos son ampliamente usados en terapia de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y alérgicas y para pacientes transplantados (Swartz y Dluhy, 1978; Boumpas et al., 1993; Barnes y Adcock, 1998). También son utilizados para el tratamiento de edema cerebral, condiciones de shock, algunos tipos de cancer como linfomas B o T, así como también enfermedades que involucran insuficiencia de la corteza adrenal. Su uso terapéutico se basa en su conocido efecto como agentes antiinflamatorios e inmunosupresivos y por su rol en la inducción del arresto del ciclo celular y apoptosis. El GC sintético usando en esta tesis, la Dex, se usa para aliviar la inflamación (infiltración, calor, enrojecimiento y dolor) y también es usado para tratar determinadas formas de artritis y desórdenes en la piel, sangre, riñón, ojos, tiroides e intestinales (por ejemplo, colitis), alergias severas y asma. La Dex también es utilizada para el tratamiento de determinados tipos de cancer.

### *1.6.3. Estructura del receptor de Glucocorticoides*

El GR presenta tres dominios estructurales bien definidos: un dominio N-terminal de transactivación poco conservado entre los receptores esteroideos, un dominio central de unión al DNA (DBD) y un dominio C-terminal de unión a ligando que también cumple funciones de transactivación (Fig. 11).

El DBD contiene dos iones zinc que están coordinados con ocho residuos de cisteínas para formar dos dedos de zinc. El dedo de zinc N-terminal está involucrado directamente en la unión al DNA y el C-terminal principalmente determina la dimerización dependiente de DNA (Beato et al., 1989; Schoenmakers et al., 2000). La función principal del DBD es discriminar entre elementos respondedores en el DNA y es cumplida por unos pocos aminoácidos claves situados en una porción del dedo de zinc C-terminal denominada caja P (P-box) (Liden et al., 1997).



**Figura 11: Estructura del GR.** Dominios funcionales del GR. El extremo N-terminal es el menos conservado entre receptores nucleares y es donde encontramos uno de los dominios de transactivación (AF1). El dominio de unión al DNA (DBD: *DNA binding domain*) codifica una secuencia que en la proteína plegada madura adopta una conformación en dedos de zinc con las cajas P y D involucradas en unión al DNA y dimerización. En el extremo C-terminal se haya el dominio de unión a ligando (LBD: *ligand binding domain*) que además de unir a las hormonas cumplen funciones de transactivación y localización nuclear (NLS: *nuclear localization signal*).

#### 1.6.4. Bases moleculares de la acción de Glucocorticoides

Los GC son compuestos lipofílicos con la capacidad de difundir libremente a través de la membrana celular y unirse a su receptor citoplasmático. Los GC llevan a cabo sus efectos biológicos a través de su unión al GR, el cual es un FT activado por ligando que regula de manera positiva o negativa la expresión de sus genes blanco (Ashwell et al., 2000; De Bosscher et al., 2000; De Bosscher et al., 2003).

El GR pertenece a una gran superfamilia que incluye receptores para otras hormonas esteroides, hormona tiroidea, vitamina D3, ácido retinoico y receptores huérfanos como Nur77. El GR existe en el citosol de manera inactiva formando parte de un complejo con chaperonas como proteínas heat shock (hsp) e inmunofilinas (Pratt et al., 1997). Las proteínas hsp-90 y hsp-70, tienen actividad ATP-asa y son indispensables para el correcto ensamblado del

complejo (Morishima et al., 2000). Además, su acción es positiva o negativamente regulada por co-chaperonas como FKBP1/2, dineína, p23, hsp-40/hdj1, hip, CHIP y BAG-1 (DeFranco y Guerrero, 2000). La activación e hiperfosforilación del receptor ocurre luego de la unión del ligando al receptor, lo que inicia la substitución de la inmunofilina FKBP51 por FKBP52 y el reclutamiento de la dineína. El complejo GR-hsp90-dineína-FKBP52 migra al núcleo tras lo cual el complejo se disocia (Dittmar y Pratt, 1997; Ashwell et al., 2000; Davies et al., 2002; De Bosscher et al., 2003). En el núcleo el GR se une como un homodímero a secuencias específicas palindrómicas en el DNA, los elementos de respuesta de GC (GRE) (Fig. 12). Los genes regulados de manera positiva por el GR tienen GRE en sus promotores el cual consiste en dos mitades de seis nucleótidos conservadas separadas por tres bases no conservadas (5'GGTACAnnnTGTTCT'3) que poseen afinidad por estructuras diméricas (Beato et al., 1989) (Fig 12). La interacción entre el GR y GRE resulta en el reclutamiento ulterior de coactivadores y factores basales de la transcripción que reclutan a la polimerasa II (Pol II) y terminan de conformar el aparato basal de la transcripción para disparar la iniciación de la misma (Geserick et al., 2005).

El GR puede regular negativamente la expresión de genes por el mecanismo denominado represión por “transactivación” en el cual el GR induce la expresión de proteínas inhibitorias de vías de transducción de señales (Fig. 12). Como ejemplos en el sistema inmune podemos mencionar: I $\kappa$ B, que secuestra los factores NF- $\kappa$ B en el citoplasma (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995b); MKP-1 una proteína que bloquea la señalización de MAPKs (Kassel et al., 2001), y GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper), un FT de cierre de leucinas inducible por GR que bloquea la apoptosis en células T mediante la inhibición de AP-1 y NF- $\kappa$ B (Mittelstadt y Ashwell, 2001).

La inhibición transcripcional directa puede lograrse mediante la interacción del GR monomérico con elementos GRE negativos (nGRE) (Fig. 12) (Drouin et al., 1998). Los nGRE son mitades de GRE poco conservados presentes en los promotores de diversos genes como POMC, PRL,  $\beta$ -fetoproteína, CRH, osteocalcina, proliferina y recientemente para el promotor de Fas-L (Novac et al., 2006). El mecanismo íntimo de este proceso permanece desconocido. Aunque se ha propuesto el desplazamiento de la proteína ligadora de TATA (TBP) (Meyer y Schmidt, 1997), esto no podría explicar el efecto en sitios nGRE lejanos del inicio de la transcripción. Recientemente mediante un nuevo método de exploración de unión al DNA

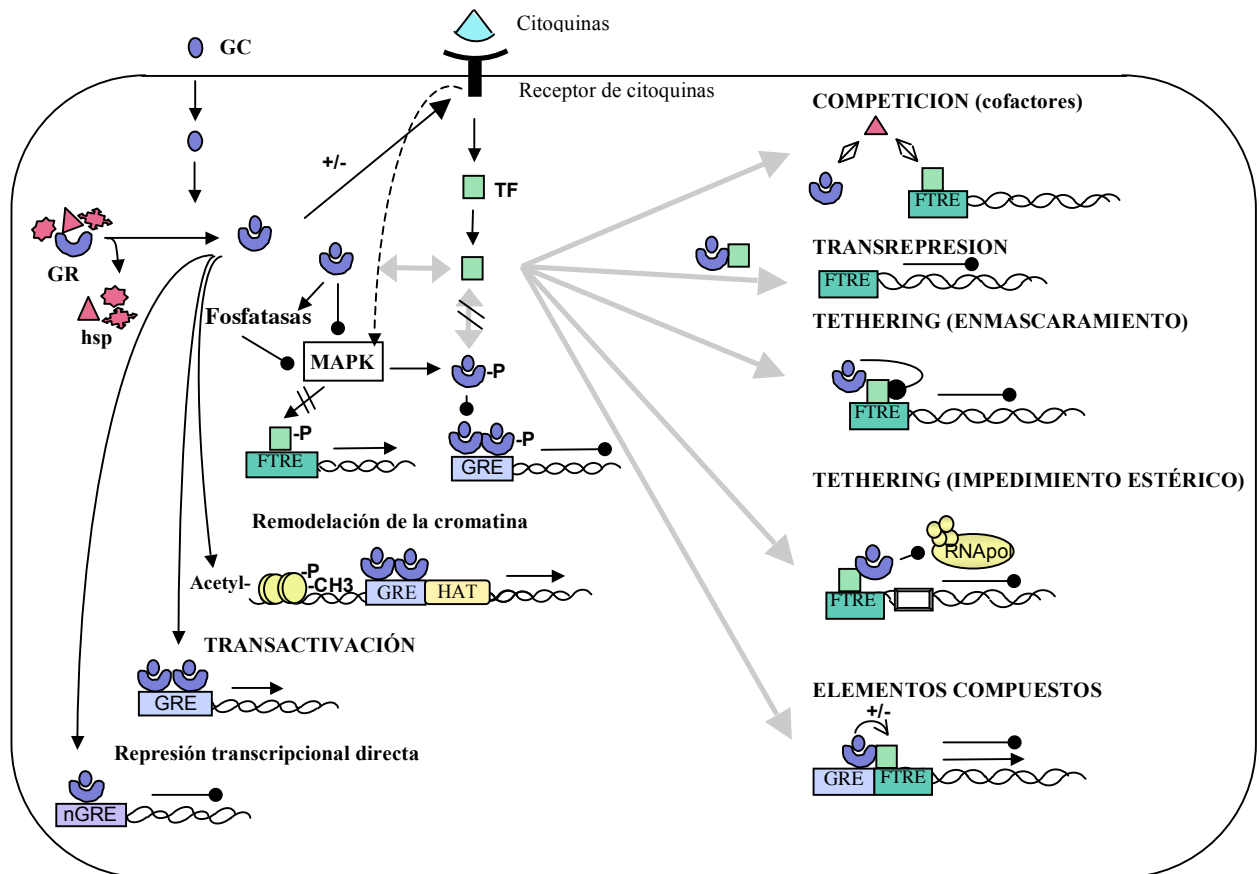
(ABCDE method) se propuso que estos sitios podrían permitir a los GR reclutar corepresores que inhiban la transcripción (Dostert y Heinzl, 2002).

Como no se puede encontrar nGRE en la mayoría de los genes inflamatorios, la interferencia transcripcional fue descubierta como consecuencia casi exclusiva de la interacción entre el GR y otros FT como NF- $\kappa$ B, AP-1 y STATs. El efecto antiinflamatorio mediado por GC se debería fundamentalmente a la interacción entre el GR activado y FT que median la expresión de genes inflamatorios. Este mecanismo se llama “transrepresión” e involucra la asociación física directa entre el GR y FT (Fig. 12). Por este mecanismo los GC modularían ya sea la unión o la actividad de estos FT y por lo tanto modificarían la expresión de genes inflamatorios.

Para algunos genes el mecanismo también puede involucrar la interferencia directa o indirecta del GR con la actividad transcripcional de FT unidos al DNA (Fig. 12). En los “elementos tethering por enmascaramiento” el GR sin unirse al DNA, actúa vía interacciones proteína-proteína con otros FT que se han unido específicamente a los sitios de respuesta en el DNA impidiendo la transcripción. En los “elementos tethering por impedimento estérico” el GR impide el reclutamiento de manera estérica de la RNA polimerasa (RNA pol) también inhibiendo la transcripción. En los “elementos compuestos” están involucrados los GRE y otros sitios de unión para FT (FTRE) y tienen cierto grado de solapamiento donde el GR puede actuar ya sea aumentando o disminuyendo la transcripción de los genes involucrados. Por ejemplo AP-1: si el dímero AP-1 adyacente es Jun-Jun el GR puede inducir la transcripción, pero si el dímero es Jun-Fos, la reprime (Pearce et al., 1998).

Cabe destacar que el mecanismo de represión por “competencia por cofactores” (Kamei et al., 1996) (Fig. 12) es poco probable dada la inmensa disponibilidad de cofactores en el núcleo y la compartimentalización en dominios nucleares de los focos de transcripción, y además porque hay incongruencias entre la especificidad de la transrepresión y la competencia por factores ubicuos y además por la evidencia directa de que la represión permanece en ausencia de pegado a cofactores (De Bosscher et al., 2000; De Bosscher et al., 2003).

Además un nuevo nivel de acción ha sido reportado para la inhibición por GC, donde estos esteroides reprimen la transcripción de IL-8 mediada por NF- $\kappa$ B bloqueando la fosforilación de la Ser 2 del dominio C-terminal (CTD) de la Pol II, una condición necesaria para la iniciación y elongación de la transcripción (Nissen y Yamamoto, 2000).



**Figura 12:** Esquema básico que muestra los distintos mecanismos de regulación transcripcional por GC: transactivación, GRE negativos (nGRE) y transrepresión. Abreviaturas: FTRE, elementos de respuesta para el FT; GRE, elementos de repuesta del GR; RNAPol, RNA polimerasa; HAT, histona acetil transferasa; MAPK, proteín quinasa activada por mitógenos; P, residuos fosforilados; Acetyl, residuos acetilados, CH3, residuos metilados.

### 1.6.5. Regulación de la actividad inmune por Glucocorticoides

El efecto principal que subyace al rol inmunosupresor y antiinflamatorio de los GC es el bloqueo de la síntesis, liberación y señalización de citoquinas y otros mediadores que participan en las respuestas inmunes. Ellas incluyen: *citoquinas*: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$ ; *quemoquinas*: IL-8, RANTES y MIP-1; *mediadores y enzimas de la inflamación*: histamina, bradiquinina, eicosanoides, óxido nítrico, COX-2, colagenasa y elastasa; y *moléculas de adhesión*: ICAM-1 (Barnes y Adcock, 1998; Refojo et al., 2001;

Riccardi et al., 2002). La mayoría de las citoquinas y mediadores involucrados en inflamación dependen de la activación de algunos FT como NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT y CREB (Barnes y Adcock, 1998; Refojo et al., 2001; De Bosscher et al., 2003; Refojo et al., 2003).

A nivel celular, los GC inhiben la activación y proliferación de linfocitos T y B, inducen apoptosis tímica y controlan la apoptosis inducida por activación en la periferia, (Distelhorst, 2002; Winoto y Littman, 2002; Jondal et al., 2004) e inhiben la quimiotaxis de granulocitos.

Existen distintos niveles de interacción entre los GC y las citoquinas cuyo resultado final es la regulación de la expresión de las respuestas inmunes (Lieberman et al, 2006). El primer nivel de interacción comienza con la regulación selectiva (inducción o represión) de la expresión de los genes que codifican para los receptores de citoquinas. Un segundo nivel involucra la interacción entre el GR activado y los FT implicados en la regulación de la síntesis y función de citoquinas. Esta interacción resulta en la inducción o represión de la transcripción de genes. Además, cuando las vías de transducción de señales inducidas por citoquinas interactúan con el GR puede haber un aumento o una inhibición de la expresión de genes regulados por GRE. Además, modificaciones post-traduccionales como ser acetilación, metilación y fosforilación junto con componentes proteicos específicos de la maquinaria remodeladora de la cromatina tienen un rol en mantener el tráfico y recambio del GR y FT en los sitios activos de la transcripción y por lo tanto modifican la expresión de genes inmunes (Fig. 12).

#### *1.6.5.1. Regulación de receptores de citoquinas por Glucocorticoides*

La regulación de receptores de citoquinas por GC es compleja. Por un lado, los GC son capaces de inhibir la expresión de genes de algunos receptores como los de IL-2, IL-4 e IL-12 (Gillis et al., 1979; Reed et al., 1986; Boumpas et al., 1991; Mozo et al., 1998; Wu et al., 1998; So et al., 2002). Particularmente, el receptor para la citoquina IL-12, citoquina clave involucrada en la diferenciación y mantenimiento del linaje Th1, es inhibido por GC. Al respecto, se ha demostrado que los GC inhiben la respuesta de los monocitos activados y células T a IL-12 a través de la inhibición de la expresión en superficie de la cadena beta 1 y beta 2 del receptor de IL-12 de manera consistente con su acción antiinflamatoria (Wu et al., 1998).

A su vez pueden inducir la expresión de otros receptores como los de IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) e IL-7 (Hawrylowicz et al., 1994; Sapi et al., 1995; Mori et al., 1998; Lee et al., 2005). La



acción de los GC sobre el receptor de IL-1 es aún más compleja por la existencia no solo de del receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI), si no también por la presencia del receptor tipo II (IL-1RII) el cual es incapaz de transducir señales y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) el cual actúa como un antagonista endógeno de la IL-1 (Dinarello, 1994). Ha sido descrito que los GC inhiben la secreción y acción de la IL-1 y que los niveles de GC e IL-1ra aumentan durante las infecciones bacterianas siendo ambos claves para la inhibición de las secuelas patológicas de una acción exagerada de la IL-1 (Arzt et al., 1994; Kovalovsky et al., 1998). Finalmente los GC cierran la producción de IL-1ra y resetean la capacidad de respuesta de los monocitos (Arzt et al., 1994; Kovalovsky et al., 1998). Estas acciones aparentemente contradictorias de los GC se deben a su importancia fisiológica en el control final de la respuesta inmune. En paralelo a la inhibición de IL-1ra, los GC aumentan la expresión de IL-1RII asegurándose el apagado de la señalización vía IL-1 (Brown et al., 1996).

#### *1.6.5.2. Interacción molecular entre el receptor de glucocorticoides y citoquinas inflamatorias: Rol de los factores de transcripción*

Durante los últimos años ha surgido una enorme cantidad de información acerca del rol de las citoquinas en la inflamación. Al respecto han sido clasificadas como proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18) y antiinflamatorias (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) de acuerdo a sus actividades biológicas facilitadoras o inhibidoras del ambiente inflamatorio respectivamente. La regulación del balance entre ellas sería esencial para el componente inflamatorio de una respuesta inmune. Los GC participan de esta regulación.

Las observaciones enunciadas en la primera parte de esta introducción muestran la importancia de las citoquinas en regular una respuesta inmune eficiente y también el riesgo de patologías cuando el balance de este sistema se sale de control. La regulación del balance Th1/Th2 es esencial para el desarrollo de una respuesta inmune y los GC contribuyen a regular este balance (Kovalovsky et al., 2000; Liberman et al., 2003; Refojo et al., 2003).

Las acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras de los GC resultan de la inhibición de la actividad de FT como AP-1, NF- $\kappa$ B y STAT, involucrados en la activación de genes proinflamatorios e inmunoregulatorios como los genes de las citoquinas, receptores de citoquinas, proteínas quimiotácticas y moléculas de adhesión. El primer mecanismo de transrepresión descrito para explicar la actividad antiinflamatoria de los GC involucra la

interacción física entre GR y AP-1 (Jonat et al., 1990; Schule et al., 1990; Helmberg et al., 1995). NF- $\kappa$ B está presente en una amplia variedad de tipos celulares dentro del sistema inmune y regula un amplio repertorio de genes de citoquinas inflamatorias. En la mayoría de las células de mamíferos los miembros más abundantes de la familia de FT NF- $\kappa$ B son p65 (RelA)/p50. La inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B por GC es importante para las acciones antiinflamatorias mediadas por GR. Como se mencionó, existen dos mecanismos moleculares principales involucrados en la inhibición mediada por GC de las citoquinas que se hayan bajo la regulación de NF- $\kappa$ B. La primera involucra la interacción física entre el GR y NF- $\kappa$ B (Ray y Prefontaine, 1994; Caldenhoven et al., 1995; Scheinman et al., 1995b; Wissink et al., 1998) (Fig. 13). El segundo mecanismo involucra la inducción de la síntesis de I $\kappa$ B el cual retiene proteínas NF- $\kappa$ B en el citoplasma y bloquea la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995b; Costas et al., 2000) (Fig. 13). La interacción directa entre el GR y AP-1 o NF- $\kappa$ B, resulta en la inhibición de citoquinas inflamatorias como TNF e IL-1 (Scheinman et al., 1995b). Otras citoquinas inflamatorias y quemoquinas blanco de la inhibición por GR a través de la inhibición de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B son IL-6, los promotores de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) y de IL-8 (Mukaida et al., 1994; Scheinman et al., 1995b; Nissen y Yamamoto, 2000). La modulación del promotor de IL-2 es un ejemplo bien establecido de la regulación mutua entre AP-1 y GC, en la cual AP-1 junto con NFAT induce la expresión de genes actuando sobre sitios NFAT y los GC inhiben la activación por interacción directa proteína-proteína afectando la unión cooperativa entre dímeros de NFAT y AP-1 (Vacca et al., 1992). Un mecanismo similar que involucra NFAT o sitios GATA-3/NFAT/AP-1 fue descrito para IL-4 e IL-5 (Mori et al., 1997b; Chen et al., 2000c; Jee et al., 2005). La expresión de IFN- $\gamma$  también es inhibida por GC e involucra “elementos tethering” (descritos en la sección I.7.1) AP-1/CREB/ATF (Cippitelli et al., 1995). A pesar que el mecanismo transrepresivo involucrado en la inhibición de AP-1 es muy similar a la transrepresión de NF- $\kappa$ B, una mutación en el primer dedo de zinc del GR es capaz de afectar la inhibición de NF- $\kappa$ B y no de AP-1 (Tao et al., 2001) mostrando que los requerimientos para la transrepresión no son idénticos.

La interacción entre el GR y miembros de la familia de FT de los STATs resulta en la regulación de la expresión de receptores de citoquinas o de la señalización mediada por citoquinas. Los GC inducen la expresión del receptor de IL-6, en parte debido a la modulación de varios caminos intracelulares de señalización en los cuales FT como STAT-3 y STAT-5 estarían involucrados (von Laue et al., 2000). Los GC bloquean la señalización de IL-2 vía el

transductor de señales de la quinasa Janus (Jak) y los caminos inducidos por STAT (Bianchi et al., 2000). También ha sido reportado que los GC inhiben los caminos de señalización de IL-4 por inhibición de la expresión del receptor de IL-4 inducida por IL-4 y la activación de STAT-6 a nivel de la fosforilación en tirosina y su unión al DNA. Esto está relacionado con el antagonismo funcional entre el receptor esteroideo y STAT-6 en sus respectivas actividades transcripcionales (So et al., 2002).

Por lo tanto, la interacción entre el GR y STAT resulta en un aumento sinérgico o inhibición de la actividad transcripcional de genes regulados por los STATs. STAT-5 y GR sinergizan en el promotor de  $\kappa$ -caseína pero antagonizan en la inducción por GC de la actividad del promotor viral de tumores mamario murino (MMTV) (Lechner et al., 1997; Pfitzner et al., 1998). Recientemente también se describió una cierta cooperación entre STAT-5 y GR en el promotor del gen de bcl-X involucrado en apoptosis de timocitos (Rocha-Viegas et al., 2006). STAT-3 sinergiza con GC en el promotor de  $\kappa$ -fibrinógeno (Zhang et al., 1997a). STAT-1, GR y el FT de la familia Ets PU.1 cooperan para aumentar la expresión inducida por IFN- $\gamma$  de Fc $\gamma$ RI (Aittomaki et al., 2000). Además los GC son capaces de inhibir la inducción de la fosforilación inducida por IL-12 de STAT-4 y la producción de IFN- $\gamma$  sin afectar la fosforilación de STAT-6 inducida por IL-4 (Franchimont et al., 2000; Fahey et al., 2006). Por otro lado, los GC inducen la activación de STAT-4 inducida por IFN- $\gamma$  y la producción de IL-10. Estos efectos están asociados con una inhibición de la expresión de la cadena beta 1 del receptor de IL-12 y una inducción del receptor de IFN- $\gamma$ . Por lo tanto el efecto de los GC en los caminos de señalización mediados por STAT-4 depende del estímulo que active esta vía. Estos resultados contribuirían a explicar la acción inhibitoria de los GC sobre las respuestas inmunes celulares Th1 y el shift hacia las respuestas inmunes humorales inducidas por GC (Blotta et al., 1997; Ramirez, 1998). Como fue descrito en las secciones anteriores, el FT GATA-3 dirige la diferenciación Th2 (Zhang et al., 1997a) y el FT T-bet induce respuestas Th1 (Szabo et al., 2000), por lo que el análisis de la acción de los GC sobre la actividad de estos FT resulta clave para entender este proceso.

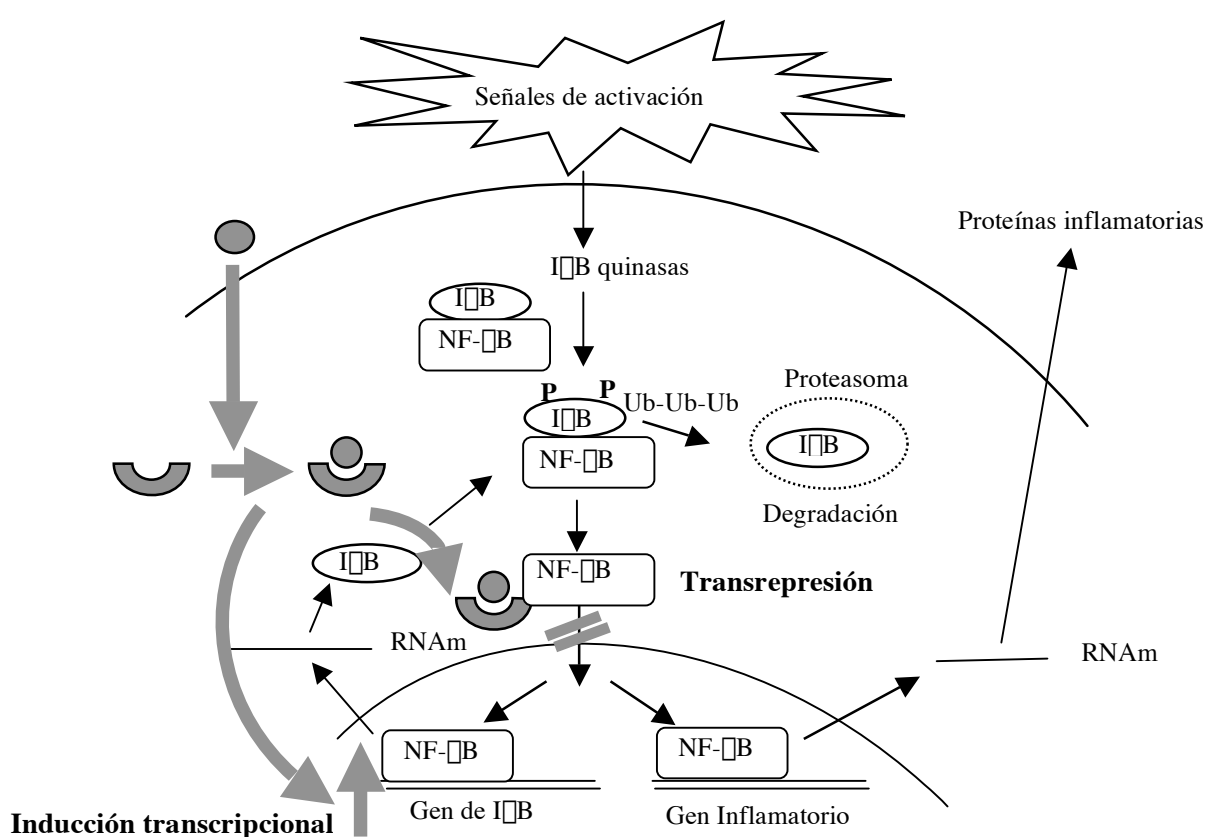
De manera interesante, los caminos de señalización entre GC e IL-4 también interactúan como fue demostrado por la inhibición por GC de la proliferación inducida por IL-4 y la inhibición mediada por IL-4 de la apoptosis inducida por GC. La base molecular de esta inhibición mutua se debe a la asociación mutua entre el GR y STAT-6 en linfocitos T (Biola et al., 2000).

La señalización inducida por citoquinas y los FT no solo regulan la acción y expresión de las citoquinas, sino que también afectan a su vez las respuestas mediadas por el GR. Así, TNF- $\alpha$  e IL-1 aumentan la actividad transcripcional del GR afectando su acción biológica (Costas et al., 1996; Costas et al., 2000), constituyéndose en un claro ejemplo de modulación por citoquinas de la sensibilidad al GR de sus genes blanco.

La interacción entre las señales inmunes y los GC también tienen lugar en la regulación de la apoptosis de timocitos e hibridomas T, en las que tanto las señales de los GC y el TCR inducen la apoptosis pero también el antagonismo mutuo (Ashwell et al., 2000). Este modelo de antagonismo mutuo muestra un rol central de las señales derivadas tanto del TCR como de GC en la inducción de la apoptosis y en la inhibición mutua. La inhibición de la síntesis de esteroides en el timo con metirapona en presencia de anti-CD3 disminuye el número de células doble positivas mediante la inducción de las señales pro-apoptóticas del TCR (Vacchio y Ashwell, 1997). En líneas celulares de hibridomas se ha demostrado que NF- $\kappa$ B actúa como un factor proapoptótico en la muerte celular inducido por TCR y como un factor antiapoptótico en la apoptosis inducida por GC a pesar que no tiene un rol en la inhibición mutua que ocurre entre estos dos caminos (Lin et al., 1999). AMPc sinergiza la acción de GC y antagoniza la apoptosis inducida por el TCR en hibridomas T (Muller Igaz et al., 2002). Resulta interesante que el efecto pro-apoptótico de los GC en timocitos de ratón también es antagonizado por melatonina probablemente a través de la inhibición del camino mitocondrial por inducción de la proteína antiapoptótica Bax (Hojman et al., 2004).

Los GC previenen la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$  en la línea fibroblástica murina L-929 (Kull, 1988; Costas et al., 1996; Costas et al., 2000) el cual es el efecto contrario al que producen en otras líneas celulares en las cuales inducen apoptosis (Armant et al., 1995). En las neuronas o en los linfocitos los GC tienen un efecto dual dependiendo del estímulo (Zacharchuk et al., 1990). Además células sensibles a la apoptosis inducida por GC pueden ser rescatadas de la muerte por citoquinas (Dancescu et al., 1992). En particular, en las células fibroblásticas L929 se observa un aumento de la síntesis de I $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  o GC y además los GC inhiben la transactivación de NF- $\kappa$ B vía inducción de I $\kappa$ B (Costas et al., 2000). Además, los GC protegen de la apoptosis inducida por TNF aún cuando la actividad de NF- $\kappa$ B es inhibida por la expresión transiente o estable del supresor I $\kappa$ B, demostrando que a pesar que los GC inhiben la transactivación de NF- $\kappa$ B en fibroblastos, la protección de la

apoptosis inducida por TNF es dependiente de NF- $\kappa$ B y que el efecto anti-apoptótico en estas células no involucra NF- $\kappa$ B sino más bien, genes blancos de GRE (Costas et al., 2000). En este contexto, como un correlato fisiológico funcional del aumento de la transactivación vía GRE, el pretratamiento de fibroblastos con bajas dosis de TNF aumenta la sensibilidad a la inhibición por GC de la apoptosis inducida por TNF. Este paradigma muestra que la interacción entre FT con el GR también está involucrada en la regulación de la apoptosis. Por lo tanto la acción regulatoria mutua entre el GR y FT que controlan y median la acción de genes inmunes dan cuenta del balance final de la respuesta inmune.



**Figura 13: Inhibición por GC de la actividad del FT NF- $\kappa$ B.** La activación de NF- $\kappa$ B involucra la fosforilación de la proteína inhibitoria I $\kappa$ B por quinazas específicas, con la subsecuente ubiquitinación y degradación proteolítica por el proteasoma. El NF- $\kappa$ B libre trasloca al núcleo donde se une a sitios  $\kappa$ B en las regiones promotoras de genes inmunes. Los GC son capaces de inhibir la actividad de NF- $\kappa$ B principalmente mediante dos mecanismos distintos. El primero implica la transrepresión por interacción proteína-proteína entre el GR activado y NF- $\kappa$ B y la segunda implica la activación del gen de I $\kappa$ B que resulta en un aumento de la síntesis de I $\kappa$ B para terminar con la activación de NF- $\kappa$ B.

### *1.6.5.3. Importancia de la fosforilación de factores de transcripción y de la interacción entre los caminos de señalización mediada por quinasas y los Glucocorticoides*

Las hormonas esteroideas y las citoquinas activan varios caminos de señalización a través de receptores intracelulares o de membranas respectivamente. En las células inmunes la interacción entre estos caminos de señalización afectan procesos celulares fundamentales como proliferación, diferenciación y apoptosis. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la interacción entre los caminos de señalización de GC y citoquinas permanecen sin ser cabalmente comprendidos. Las citoquinas pueden disparar cascadas de señalización mediadas por proteínas quinasas (MAPK) lo cual lleva a la activación de varios FT como AP-1, NF- $\kappa$ B y STATs. Como ya describimos en secciones anteriores, estos FT pueden activar genes involucrados en la inflamación y regulación de citoquinas, receptores de citoquinas, proteínas quimiotácticas y moléculas de adhesión. También pueden establecer interacciones proteína-proteína con el GR regulando el resultado final de la respuesta inmune. Por otro lado, los caminos de señalización mediados por MAPK activados por citoquinas pueden fosforilar el GR (Orti et al., 1989; Rogatsky et al., 1998; Itoh et al., 2002) regulando su recambio (Webster et al., 1997) y actividad transcripcional (Almlöf et al., 1995; Webster et al., 1997; Hittelman et al., 1999) probablemente regulando así su actividad inmune. A su vez, el GR también puede inhibir la actividad de varias MAPK e inducir la actividad de MAPK fosfatasas (Sakai et al., 1988; Rider et al., 1996; Swantek et al., 1997; Lasa et al., 2002) (Fig. 12).

Al respecto, como fue discutido en secciones anteriores, los GC tienen un rol importante en la supresión de las respuestas celulares mediadas por linfocitos Th1, inhibiendo la secreción de citoquinas Th1 y aumentando la secreción de citoquinas Th2, parcialmente debido a la inhibición de la fosforilación mediada por IL-12 de STAT-4. La inhibición de la fosforilación de STAT-4 por GC no altera otros pasos de la señalización mediada por IL-12, por ejemplo la expresión del receptor de IL-12 o la fosforilación de la tirosin quinasa 2 (Tyk2) o de Jak2. Por lo tanto el bloqueo de la fosforilación de STAT-4 inducida por IL-12 parece ser una nueva actividad supresora de los GC en las respuestas celulares Th1 y podría ayudar a entender parte del shift hacia las respuestas Th2 por una inhibición selectiva de FT involucrados en la regulación inmune (Franchimont et al., 2000).

#### *1.6.5.4. Importancia del remodelado de la cromatina en la interacción entre Glucocorticoides y Factores de Transcripción en la expresión génica*

Durante una respuesta inmune, las células del sistema inmune orquestan la integración de diversas señales dando lugar a una respuesta biológica que puede involucrar cambios estructurales en el DNA y consecuentemente, la represión o activación de genes. La acción de citoquinas y GC convergen al nivel del DNA. Las interacciones moleculares entre los caminos de señalización vía citoquinas y GC implica el reclutamiento correcto de activadores, modificadores o remodeladores de la cromatina, corepresores, coactivadores y FT que culmina con eventos varios de remodelado de la cromatina que disparan la represión o activación de genes inmunes. Por lo tanto, los mecanismos que modulan la estructura de la cromatina podrían ser esenciales para regular las repuestas inmunes (Orphanides y Reinberg, 2000). La forma condensada de la cromatina esta relacionada con la represión de genes y la forma relajada está asociada con la disponibilidad de secuencias de DNA para que se unan proteínas lo cual podría resultar en la activación de la expresión de genes. Así, la estructura de la cromatina depende de cambios en el ambiente. Las colas de histonas sobresalen fuera de los nucleosomas y son susceptibles de sufrir modificaciones post-traduccionales como acetilación, metilación, ubiquitinación y fosforilación. Existen distintas clases de modificadores de la cromatina involucrados en estos procesos: HAT (histonas acetil transferasas) (relacionadas con estructuras abiertas de la cromatina facilitando la transcripción), HDAC (histonas deacetil transferasas) (represión de la transcripción), histonas metil transferasas (represión), histonas quinasas y otras (Margueron et al., 2005). Por lo tanto, la modificación de las colas de histonas regularían la accesibilidad a las secuencias blanco del DNA. Los complejos remodeladores de la cromatina son reclutados en los promotores blanco en respuesta a distintos estímulos llevando a la decondensación del DNA y facilitando la unión de coactivadores transcripcionales que unen los FT y componentes de la maquinaria basal de la transcripción (Orphanides y Reinberg, 2002), consecuentemente regulando la expresión de genes inmunes (Fig. 12).

Los GC son utilizados frecuentemente en la terapia contra el asma y median la inhibición de una cantidad de genes de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-13 y GM-CSF, que son centrales en la patogénesis de la inflamación de las vías aéreas implicadas en el asma. La regulación de IL-4 e IL-5 está controlada por el FT Th2 GATA-3 el cual se ha demostrado que induce cambios conformacionales en la estructura de la cromatina en el locus de IL-4 y subsecuentemente

transactiva el promotor de IL-5 (Takemoto et al., 2002). Recientemente se demostró que la inhibición de la transcripción del gen de IL-5 por GC podría involucrar el reclutamiento del GR en el promotor proximal de IL-5, al cual se unen NFAT y AP-1 alterando la actividad de GATA-3, que tiene un sitio de unión muy cercano al dominio NFAT/AP-1 en el promotor de IL-5 (Jee et al., 2005).

HDAC1 está asociada con el complejo de GR en las regiones promotoras durante la estimulación hormonal y un aumento en la forma acetilada de HDAC1 se hace evidente y se correlaciona con la inhibición de la expresión de genes (Qiu et al., 2006) (Fig. 12). Como fue discutido con anterioridad, los GC inhiben NF- $\kappa$ B y esto se debe a la interferencia con la regulación de la actividad transcripcional mediada por NF- $\kappa$ B por un mecanismo que involucra la interacción directa proteína-proteína entre el GR y NF- $\kappa$ B. La deacetilación mediada por HDAC2 del GR inhibe la unión del GR a NF- $\kappa$ B (Ito et al., 2006).

Luego de su unión al DNA, el GR recluta cofactores que modulan el remodelado de la cromatina y que poseen actividad de HAT que resulta en una estructura más relajada de la cromatina promoviendo la activación de genes (Glass y Rosenfeld, 2000). Algunos de estos coactivadores también están implicadas en la funcionalidad de la maquinaria basal de la transcripción y el ensamblado del complejo de preiniciación permitiendo el acceso de la RNAPol a los sitios de inicio de la transcripción. Cantidades limitantes de estos cofactores usados por GR y otros FT podrían restringir la transactivación. Por lo tanto eventos en el remodelado de la cromatina mediados por el GR podrían modificar la expresión de genes inmunes.

Los GC ejercen sus efectos antiinflamatorios mediante la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios. Como fue mencionado con anterioridad, los GC pueden ejercer este efecto por lo menos en parte por medio de la inducción de la síntesis de I $\kappa$ B (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995b; Costas et al., 2000). Antes de la activación por GC el promotor de I $\kappa$ B posee una estructura abierta. Estudios de footprinting con DNAsa I en el promotor de I $\kappa$ B $\beta$  revelan que el tratamiento por GC es capaz de modificar la accesibilidad de varios sitios en el DNA favoreciendo e incrementando el reclutamiento de FT. Por lo tanto, la activación del promotor de I $\kappa$ B $\beta$  por GC facilita la accesibilidad y la estabilidad de la unión de FT al promotor proximal llevando a la activación de genes (Deroo y Archer, 2001).



## I.7. ROL DE LOS GLUCOCORTICOIDES EN LA DIFERENCIACIÓN T HELPER

Los mecanismos por los cuales los linfocitos Th pueden diferenciarse hacia el linaje Th1 o Th2 consisten un área de gran interés como ya se explicó con anterioridad, y claramente el entorno de citoquinas en el momento de la respuesta inmune y la expresión de los FT T-bet y GATA-3 Th específicos, tienen una enorme influencia en dicha diferenciación.

Existe una cantidad de datos indicando que los GC participan en guiar la diferenciación de las células Th. Algunos estudios muestran que el tratamiento con GC favorece el shift hacia la producción de citoquinas Th2 (Bertoglio y Leroux, 1988; Daynes y Araneo, 1989; Brinkmann y Kristofic, 1995; Blotta et al., 1997; Dozmorov y Miller, 1998; Ramirez, 1998; Visser et al., 1998; Miyaura y Iwata, 2002), mientras que otros muestran que los GC inhiben la expresión de citoquinas Th2 (Wang et al., 1993; Mori et al., 1997a; Biola et al., 2000; Chen et al., 2000a; Quan et al., 2001; Hu et al., 2003). Por ejemplo, se mostró que ratones implantados con pellets de GC de liberación sostenida y luego inmunizados con ovalbúmina, cuando las células T de éstos animales son re-estimuladas *in vitro*, producen cantidades menores de IL-2 pero mucho mayor cantidades de IL-4 (Daynes y Araneo, 1989). Se observa un viraje similar en la producción de citoquinas cuando células T de ratones tratados con ovalbúminas son re-estimulados *in vitro* con ovalbúmina en presencia de dosis bajas de GC. El efecto de GC sobre las células T podría ser directo porque el tratamiento con GC de una línea celular clonada y de un hibridoma T, también favorecen la producción de IL-4. Además, se observó que los GC aumentan la proliferación inducida por el TCR de la línea murina Th2, D10 por un aumento en la secreción de IL-4 (Bertoglio y Leroux, 1988). Otros estudios muestran que el perfil de citoquinas de células T CD4<sup>+</sup> de ratas que inicialmente han sido activadas en presencia de GC, viran hacia la producción de citoquinas Th2 cuando son activadas de nuevo pero en ausencia de GC (Ramirez, 1998). Resulta interesante que es posible generar células Th2 específicas de antígeno a partir de ratones nativos, por estimulación repetida con el antígeno en presencia de IL-2 y anticuerpos anti-IL-10, pero solo en presencia de GC (Dozmorov y Miller, 1998).

Otros estudios muestran que los GC inhiben tanto la expresión de citoquinas Th1 (Cippitelli et al., 1995; Visser et al., 1998; Miyaura y Iwata, 2002) como Th2 (Wang et al., 1993; Mori et al., 1997b; Biola et al., 2000; Chen et al., 2000c; Quan et al., 2001; Hu et al., 2003), pero el efecto inhibitorio sería más fuerte en las citoquinas Th1 (Franchimont et al., 1998; Hu et al., 2003).

En este sentido, la producción de IL-12 por linfocitos de sangre periférica, que favorece el desarrollo del linaje Th1, es inhibida por GC, mientras que la producción de IL-10 (que favorece el shift hacia el linaje Th2) es apenas inhibida o casi resistente a dicha inhibición (Visser et al., 1998). Podría ser que los GC inhiben la producción aguda de citoquinas tanto Th1 como Th2, y que su presencia durante la activación inicial promueva la diferenciación hacia el linaje Th2.

El estudio de los efectos regulatorios de los GC en la señalización por citoquinas podría ayudar a clarificar como estas hormonas influyen las respuestas inmunes Th1 y Th2. Aparte de la interacción en el promotor de IL-5 entre los GC y NFAT o GATA-3 (Chen et al., 2000b; Quan et al., 2001; Jee et al., 2005), AP-1 o NF- $\kappa$ B (Mori et al., 1997b; Jee et al., 2005), la interacción entre GR y STAT-6 (Biola et al., 2000) y la inhibición de la fosforilación de STAT-4 por Dex (Franchimont et al., 2000), existe muy poca evidencia acerca del mecanismo molecular implicado en la regulación por GC de la diferenciación Th. Por lo tanto el estudio de la interacción entre los GC y los FT claves involucrados en la regulación del linaje Th, T-bet y GATA-3 resulta sumamente importante para llegar a comprender la modulación inmune mediada por GC.

## **II. OBJETIVOS**

---

## II.1. OBJETIVOS

Sobre la base de las consideraciones mencionadas con anterioridad, el objetivo central de esta tesis es analizar la interacción de GC, citoquinas y FT en la regulación del fenotipo del linfocito Th.

Los objetivos específicos son:

- estudiar la regulación del FT T-bet involucrado en la diferenciación Th1, por GC y su interacción con citoquinas inmunomodulatorias. Esta regulación fue estudiada a nivel de la expresión del RNAm, proteína y actividad transcripcional.
- estudiar la regulación del FT GATA-3 involucrado en la diferenciación Th2, por GC y su interacción con citoquinas inmunomodulatorias. Esta regulación también fue estudiada a nivel de la expresión del RNAm, proteína y actividad transcripcional.
- evaluar la participación de los FT y de GC en la regulación de la actividad de los promotores de las citoquinas moduladoras del switch Th1/Th2 (IFN- $\gamma$  e IL-5).
- analizar el mecanismo molecular intrínseco implicado en dicha regulación.
- estudiar si existen mecanismos post traduccionales implicados.

## **III. MATERIALES Y METODOS**

---

### **III.1. APARATOS, ESTÍMULOS, ANTICUERPOS E INHIBIDORES**

#### **III.1.1. Aparatos o dispositivos especiales**

Incluimos solo aquellos aparatos que tienen alguna característica específica de aplicación en los experimentos de esta tesis, no aquellos generales como campanas de flujo laminar o centrífugas.

- Electroporador gene pulser II (BioRad, Hercules, CA, EUA)
- Termociclador MJ (MJ research, Waltham, Massachusetts, EUA)
- Termociclador para PCR en tiempo real (Opticon, Orangeburg, NY, EUA)
- Luminómetro Junior (Berlthold, Bad Wildbad, Alemania)

#### **III.1.2. Estímulos, hormonas e inhibidores farmacológicos**

Actinomicina-D, RU38486, AMPc, Ionomicina, PMA, Dexametasona e Hidrocortisona (Sigma, St Louis, MO, EUA).

Inhibidores farmacológicos: H89, SB203580 (Calbiochem, San Diego, CA, EUA),

#### **III.1.3. Anticuerpos, citoquinas y productos relacionados**

Se utilizaron los siguiente anticuerpos:

De la empresa Cell Signalling (Beberly, MA, EUA)

IgG monoclonal de conejo anti fosfo-p38 (P-p38) de ratón.

IgG monoclonal de conejo anti p-38 total de ratón.

IgG monoclonal de conejo anti fosfo-treonina (p-treonina) total de ratón.

De la empresa Santa Cruz Laboratories (CA, EUA)

IgG monoclonal de ratón anti GATA-3 de ratón, humano y conejo.

IgG policlonal de conejo anti GR de ratón.

IgG monoclonal de ratón anti T-bet de ratón y humano.

IgG policlonal de conejo anti-IL-12 de ratón.

IgG policlonal de conejo anti-IFN- $\gamma$  de ratón.

De la empresa BD Pharmigen (San Diego, CA, EUA)

IgG policlonal de conejo anti-IL-4 de ratón.

De la empresa BIORAD (Hercules, CA, EUA)

IgG-HRP policlonal de cabra anti-conejo.

IgG-HRP policlonal de cabra anti-ratón.

De la empresa Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL, EUA)

ELISA para detección de IL-5 e IFN- $\gamma$

Se utilizaron las siguiente citoquinas:

De la empresa R&D (Minneapolis, EUA)

IL-4 recombinante de ratón

IL-12 recombinante de ratón

IL-10 recombinante de ratón

IFN- $\gamma$  recombinante de ratón

IL-2 recombinante de ratón

Para enriquecer en la expresión de T-bet:

IL-12 (5 ng/ml) e IL-10 (10 ng/ml) durante nueve días.

Para lograr la expansión clonal de las células enriquecidas:

IL-2 (10 U/ml) durante nueve días.

Para ver expresión del RNAm de T-bet en cultivos primarios de esplenocitos:

IL-12 (5 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (5 ng/ml), durante 24 hs.

Para ver expresión del RNAm de GATA-3 en cultivos primarios de esplenocitos:

IL-4 (10 ng/ml) durante 24 hs.

#### III.1.4. Mitógenos

Concanavalina A, derivada de *Canavalia Ensiformis* (Sigma, St Louis, MO, EUA)

#### III.1.5. Otros reactivos o materiales

De la empresa *Sigma*, (St Louis, MO, EUA):

RPMI-1640, RNAsa A, BSA 99 % de pureza, Glutamina

De la empresa *Gibco BRL-Life Technologies-Invitrogen* (New York, EUA):

Penicilina-estreptomocina y PBS estéril.

De *Roche Diagnostics* (Roche, Basilea, Suiza):

dNTPs, TAQ DNA polimerasa.

De la empresa *Promega* (Madison, WI, EUA):

Enzimas de restricción, MMLV-RT, RNAsin, Passive Lysis Buffer, Klenow large fragment, T4-PNK, Kit para detección de actividad luciferasa.

De la empresa *Qiagen* (Hylden, Alemania):

Columns QIAGEN<sup>®</sup> de afinidad para purificación de DNA plasmídico y Kit QIAEX<sup>®</sup> de purificación de DNA a partir de geles de agarosa.

Otros reactivos o materiales utilizados se listan a continuación con la empresa proveedora:

Aprotinina (Trasylol<sup>®</sup>) (*Bayer*, Koln, Alemania)

Fenol neutro (Roti-Phenol<sup>®</sup>) (*Carls Roth GmbH*, Karlsruhe, Alemania).

Heptanucleótidos al azar (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA)

Para el cultivo de células se utilizaron materiales descartables como botellas de cultivo, placas de petri, tubos cónicos de centrifuga, criotubos y pipetas de las marcas Renner, TTP, Eppendorf, Axigen, NUNC y Corning.



### III.1.5.1. Estímulos utilizados

Los GC utilizados fueron Dex (GC sintético) e hidrocortisona (HC, GC natural) en concentraciones entre 0.01-1000 nM, las cuales cubren un rango de dosis de GC fisiológico-farmacológico, a tiempos cortos (1 h) y tiempos largos (24 y 48 hs) y en presencia o ausencia de las citoquinas diferenciadoras IL-4 (10 ng/ml), IL-12 (5 ng/ml), IL-10 (10 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (5 ng/ml).

Algunos experimentos fueron realizados en presencia del antagonista específico del GR, el RU38486 (1  $\mu$ M), agregado 30 minutos antes del agregado de GC para probar la especificidad de la acción del GR.

Algunos experimentos fueron realizados en presencia de los inhibidores de quinasas, agregados 1 hora antes del agregado de AMPc:

H89: inhibidor de la proteína quinasa A (PKA), 10, 25 y 50  $\mu$ M .

SB203580: inhibidor de phospho-p38 (P-p38), 10, 25 y 50  $\mu$ M.

Para inducir la expresión de T-bet y GATA-3 en los cultivos primarios de esplenocitos de ratón se utilizó el mitógeno T concanavalina A (Con A, 2.5  $\mu$ g/ml).

Para inducir la actividad transcripcional de T-bet se utilizó PMA (0.1  $\mu$ M) y ionomicina (1  $\mu$ M) (activadores de PKC y de canales de calcio respectivamente) y para GATA-3 se utilizó AMPc (1  $\mu$ M).

## III.2. ANIMALES

### III.2.1. Condiciones de crianza y alojamiento

Para los estudios indicados, fueron utilizados ratones BALBc machos de 8 semanas de edad. Todos los animales utilizados en este trabajo fueron criados en condiciones estándar de luz y temperatura. Luz blanca entre las 6.00 y las 18.00 hs de cada día a una temperatura constante de 22-23°C, con comida y agua administrada *ad libitum*. Los animales fueron criados a razón de 4-6 animales por caja, pero al menos una semana antes del comienzo de los experimentos,

los animales fueron alojados a razón de solo un animal por caja para minimizar los efectos estresantes de la manipulación (*handling*) al momento del experimento.

### III.3. CULTIVOS CELULARES

#### III.3.1. Cultivos primarios

##### III.3.1.1. Cultivos primarios de esplenocitos de ratón

Los bazos fueron removidos asépticamente a partir de ratones BALB-c nativos y sus células dispersadas presionando el material contra un filtro metálico bajo flujo laminar (Boyum, 1968; Raiden et al., 1995). Para obtener una suspensión homogénea de células individuales, las células fueron lavadas 2 veces con PBS estéril y resuspendidas a una densidad celular de  $2.5 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI-1640 10% SFB, 2 mM de glutamina,  $10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoetanol, penicilina (100 U/ml) y esptreptomicina (100 mg/ml y plaqueadas (200  $\mu$ l/pocillo) en placas de 6 pocillos con fondo plano. Las células fueron incubadas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 y 48 hs. Cumplido este tiempo se realizaron los tratamiento correspondientes y los ensayos de liberación de citoquinas, Northern Blots, Western Blots y ensayos de coimmunoprecipitación endógena.

##### III.3.1.2. Purificación de células T

La purificación de células T fue realizada por medio de una técnica convencional que involucra la adhesión celular al plástico (Raiden et al., 1995). Para ello los esplenocitos fueron plaqueados en placas de 6 pocillos a una densidad de  $4 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con suero y antibióticos. Luego de 120 minutos las células no adherentes fueron lavadas exhaustivamente con PBS y se les agregó medio fresco. Este procedimiento fue repetido nuevamente luego de 120 minutos. La contaminación con monocitos fue menor del 1 %. El análisis de la pureza de la población celular fue realizado por inmunofluorecencia usando anticuerpos monoclonales específicos (Serotech Laboratories Limited, Toronto, Canada): CD2, CD4, CD8, CD14, CD19, y CD45, los cuales definen antígenos en células T/NK, linfocitos Th, linfocitos T citotóxicos/supresores, monocitos/macrófagos, células B y leucocitos (el antígeno común de leucocitos), respectivamente. La viabilidad celular fue superior al 95 % como fuera evaluado mediante el colorante de exclusión azul de tripan.

Los esplenocitos fueron estimulados al principio del cultivo con el mitógeno T Con A (2.5  $\mu$ g/ml). Se estudió el efecto de los GC en los cultivos de esplenocitos durante las últimas 1, 2, 4, 8 y 24 hs de incubación para los análisis por Western Blot y las últimas 2, 6, 12, 24 o 48 hs para los ensayos de Northern Blot.

### *III.3.1.3. Enriquecimiento en la expresión de T-bet de células T*

Se obtuvieron cultivos de esplenocitos enriquecidos en la expresión de T-bet por estimulación de las células T purificadas con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs y luego por estimulación bajo condiciones diferenciadoras Th1 usando IL-12 (5 ng/ml) e IL-10 (10 ng/ml) y anticuerpo anti IL-4 (10  $\mu$ g/ml) durante 9 días. Para lograr la expansión clonal de las células enriquecidas se agregó IL-2 (10 U/ml). Luego, las células fueron cosechadas en los días 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 9 post-estimulación y los extractos celulares fueron analizados por Western Blot. La relación óptima entre la expresión de T-bet y GR se produjo al día 5. Por lo tanto las células obtenidas a partir del enriquecimiento de los cultivos celulares al día 5 fueron lavadas dos veces con PBS y se les agregó medio fresco. Luego estas células fueron estimuladas usando ionomicina (1  $\mu$ M) y PMA (0.1  $\mu$ M) en presencia de Dex, 100 nM.

### **III.3.2. Líneas celulares**

Las líneas celulares utilizadas fueron EL-4 y Jurkat, cuyo origen se detalla más abajo. Ambas líneas celulares, al igual que los cultivos primarios, fueron incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Particularidades de cada una de las líneas celulares utilizadas se detallan.

Todos los reactivos y materiales utilizados serán solo mencionados en este apartado. Los detalles sobre empresas proveedoras y país de origen se enumeran más arriba en el apartado III.1. “Aparatos, estímulos, anticuerpos e inhibidores farmacológicos” de esta sección materiales y métodos.

El medio de cultivo básico utilizado fue RPMI 1640. El RPMI fue suplementado con sodio hidrógeno carbonato (2 g/L) y Hepes (4.7 g/L).

El medio de cultivo utilizado salvo aclaración precisa, fue suplementado con SFB previamente decompuesto por calor a 65°C durante 30 min (10% final), penicilina (100 U/ml), espstreptomicina (100 mg/ml) y glutamina (4 mM). Cuando un medio de cultivo está suplementado con estos aditivos nos referimos a dicho medio como “completo”.

**EL-4:** Esta línea celular corresponde a un linfoma murino obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea fue cultivada en medio RPMI 1640 completo. La línea se mantuvo en crecimiento con pasajes cada 72 hs de una dilución 1/10.

La línea celular murina EL-4, ampliamente utilizada para los estudios con los FT, T-bet y GATA-3 (Lee et al., 1995; Siegel et al., 1995; Ouyang et al., 1998; Lee et al., 2000; Hwang et al., 2002; Klein-Hessling et al., 2003), fue crecida en el mismo medio. Las células EL-4 fueron tratadas como se indica, con PMA (0.1  $\mu$ M), ionomicina (1  $\mu$ M) o AMPc (0.5 mM) según corresponda, para generar condiciones activadoras de la expresión de T-bet o de GATA-3.

**Jurkat:** Esta línea celular deriva de una leucemia T aguda humana obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC). Esta línea fue cultivada en medio RPMI 1640 completo. La línea se mantuvo en crecimiento con pasajes cada 72 hs de una dilución 1/10.

Para el plaqueo y crecimiento de las células antes descritas se utilizaron los mismos medios en las cuales fueron mantenidas. Para todos los experimentos en los que se evaluó la acción de GC, el suero fue depletado de esteroides por charcolización. Para ello 50 ml de suero fue incubado durante 60 min a 37°C en presencia de una punta de espátula de charcol. Luego el charcol fue eliminado por dos rondas de centrifugación a 6000 rpm y filtración en filtro de 0.2  $\mu$ m de poro.

### **III.4. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS**

#### **III.4.1. ELISA de Interleuquina-5 e IFN- $\gamma$**

Los niveles de IL-5 e IFN- $\gamma$  secretados por los cultivos primarios de esplenocitos de ratón, fueron medidos utilizando kits de ELISA para IL-5 e IFN- $\gamma$  murinos (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, IL, EUA) siguiendo estrictamente los protocolos suministrados por la compañía. Los coeficientes de variación inter- e intra-ensayos fueron de 4.4 % y del 7.1 % respectivamente, con un límite de detección de 3.1 pg/ml.

### III.5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

#### III.5.1. Evaluación de la viabilidad celular por microscopía de fluorescencia

La viabilidad celular fue evaluada usando colorantes vitales fluorescentes que se intercalan en el DNA y al ser excitados por luz UV emiten a distintas longitudes de onda que mediante la utilización de filtros ópticos adecuados pueden ser observadas selectivamente por microscopía de fluorescencia (Spector et al., 1998; Zhu y Chun, 1998). En este caso hemos utilizado los colorantes naranja de acridina y bromuro de etidio. El primero es un colorante capaz de ingresar a las células viables y al ser excitado con luz ultravioleta o el haz de un láser emite a una longitud de onda de 595 nm que se observa de color verde utilizando los filtros adecuados. El segundo también es un agente intercalante conocido por su corriente utilización para teñir geles que contienen ácidos nucleicos. Este colorante ingresa solo en células no viables (colorante de exclusión) y al ser excitado emite con una longitud de onda de 526 nm y se observa de color rojo. De este modo los núcleos de las células viables aparecen teñidas de color verde con variaciones en la intensidad de la fluorescencia debido a la distribución relativa de heterocromatina y eucromatina. Los núcleos de las células no viables se tiñen a su vez, de color rojo y presentan “spots” rojos de gran intensidad característicos de las células apoptóticas y que evidencian la gran condensación de la cromatina que sigue al clivaje del DNA por endonucleasas.

Las células EL-4 y Jurkat fueron crecidas en botellas de 75 cm<sup>2</sup> de superficie durante 48 hs al cabo de las cuales fueron centrifugadas (2000 rpm, 5 min a temperatura ambiente), resuspendidas en medio fresco, plaquedas (3X10<sup>5</sup> cel/ml/well) en placas de 24 pocillos e incubadas por una hora en estufa de cultivo. Los cultivos primarios de esplenocitos de ratón se obtuvieron como se explica mas arriba y fueron plaqueados en placas de 6 pocillos en una densidad de 2.5 X 10<sup>6</sup> células/ml. Luego se aplicaron los distintos tratamientos con o sin GC y se incubaron en estufa de cultivo. Al cabo de los correspondientes tratamientos las células fueron resuspendidas en 20  $\mu$ l de medio y mantenidas en hielo. Para cada medición, 5  $\mu$ l de la suspensión de células fueron mezcladas con 5  $\mu$ l de una solución de detección de viabilidad celular (Bromuro de etidio: 20  $\mu$ g/ml, Naranja de Acridina: 1  $\mu$ g/ml en PBS) e inmediatamente depositadas sobre un portaobjetos y cubiertas con un cubreobjetos. Las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia invertido con un filtro de banda ancha que

permite la visualización simultánea de emisión de longitud de onda del espectro verde y rojo al mismo tiempo. No menos de 10 campos y de 200 células fueron contadas por tratamiento.

### III.6. TRANSFECCIONES TRANSIENTES DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

Si bien en los últimos años han aparecido en el mercado varios sistemas basados en liposomas para tranfectar células en suspensión con relativa buena eficiencia, la electroporación sigue siendo el método de referencia para la incorporación de plásmidos exógenos. No obstante nosotros hemos realizado varias pruebas preliminares con distintos tipos de liposomas comerciales (Lipofetamine, Lipofectamine+Plus reagent, Lipofectamine 2000, Fugene y otros) y con ninguno de ellos logramos mejorar la eficiencia de tranfección obtenida mediante electroporación. Por ello todas las tranfecciones en células en suspensión fueron realizadas mediante este método.

Las células utilizadas en estos ensayos (EL-4 y Jurkat) fueron mantenidas y crecidas como fuera descrito en el punto III.4.2. Para la electroporación las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio sin otro aditamento que suero al 10%, de modo que la concentración final fuese de  $5 \times 10^7$  cel/ml. Se transfirieron las células ( $10^7$  cel/ en  $200 \mu\text{l}$ ) a cubetas de electroporación de 0.4 mm de brecha (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).  $40 \mu\text{g}$  de plásmidos (en un volumen no mayor de  $20 \mu\text{l}$ ) fueron agregados a la suspensión y las células fueron entonces incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se procedió a la electroporación utilizando un sistema Gene Pulser II (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, EUA) aplicando un pulso de 250 V y  $975 \mu\text{F}$ . Inmediatamente luego del pulso se transfirieron nuevamente las células a una botella de cultivo con 25 ml de medio de mantenimiento. Luego de 12-16 hs las células se contaron nuevamente y se plaquearon a una concentración  $3 \times 10^5$  cel/ml en placas de 24 wells a 1 ml/well. Luego se aplicaron los tratamientos y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  por distintos tiempos.

Todos los datos presentados obtenidos fueron relativizados a los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa para controlar eficiencia de tranfección.

Los experimentos de tranfección fueron también repetidos en la línea celular Jurkat las cuales fueron crecidas en las mismas condiciones.

## III.7. MÉTODOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

### III.7.1. Plásmidos Utilizados

#### III.7.1.1. Plásmidos Reporteros

##### *GATA-RE-Luc:*

El plásmido reportero clonado río arriba del gen de la luciferasa (Luc) que contiene dos elementos de respuesta de GATA-3 (clonados por PCR a partir del promotor de IL-5) fue generosamente cedido por la Dra Anuradha Ray (Chen et al., 2000c).

##### *IFN- $\gamma$ -Luc:*

El promotor del IFN- $\gamma$  murino contiene la región 5' flanqueante, el promotor y 42 pb de la secuencia 5' no transcribible de la secuencia del IFN- $\gamma$  acoplado al gen de cloranfenicol acetil transferasa. Fue generosamente cedido por el Dr. Howard S. Fox (Fox et al., 1991). Esta construcción fue subclonada en el vector reportero de Luc pGL3-Basic (Promega, Madison, WI, EUA) usando las enzimas *SmaI* y *HindIII* para formar el vector de expresión IFN- $\gamma$ -Luc (pGL3-IFN- $\gamma$ -Luc), como se detalla en el siguiente apartado.

##### *IL-5-Luc:*

El fragmento del promotor de IL-5 de ratón comprendido entre las posiciones -1200 a +33 relativa al sitio del inicio de la transcripción acoplado al gen de Luc fue generosamente cedido por el Dr. Takashi Yokota (Lee et al., 1993).

##### *KB-Luc:*

Contiene un concatémoro de 3 elementos en tándem respondedores a NF- $\kappa$ B y ubicados originalmente en el enhancer del gen de la cadena  $\kappa$  de la inmunoglobulina humana. Dichos elementos fueron clonados río arriba del gen de la conalbúmina. Este plásmido fue cedido por el Dr. David J. McKean (McKean et al., 1995).

##### *MMTV-Luc:*

Contiene múltiples elementos respondedores a GC, localizados entre las posiciones -202 y -79 río arriba del sitio de comienzo de la transcripción del RNA. Fue generosamente cedido por el Dr R. Evans (Hollenberg y Evans, 1988).

*T-bet-RE-Luc:*

Los oligonucleótidos doble cadena que codifican para la sitios de unión de T-bet (Szabo et al., 2000), fueron anillados, rellenos usando la enzima klenow y subclonados con la enzima *SmaI* en el vector reportero de Luc pTATA-GL3-Basic (Promega, Madison, WI, EUA), como se detalla en el siguiente apartado.

*TK-GRE2-Luc:*

Contiene dos elementos respondedores a GC. Fue generosamente cedido por el Dr. Dietmar Spengler (Rupprecht et al., 1993).

*III.7.1.2. Vectores de Expresión.**CMV-hGR:*

El receptor de glucocorticoides humano clonado en un vector de expresión que contiene el promotor del citomegalovirus (CMV-hGR), fue generosamente cedido por Dietmar Spengler (Rupprecht et al., 1993).

*CMV/RSV- $\beta$ -galactosidasa:*

El gen de la  $\beta$ -galactosidasa humana clonado en un vector de expresión que contiene el promotor del citomegalovirus (CMV) o el promotor del fago RSV, fueron generosamente cedidos por Dietmar Spengler (Rupprecht et al., 1993).

*pcDNA3-GATA-3:*

El vector de expresión de GATA-3 murino (pcDNA3-mGATA-3), fue generosamente cedido por el Dr Jeffrey Leiden (Ho et al., 1991). El vector de expresión pcDNA3-GATA-3 fue digerido utilizando la enzima *XbaI* obteniendo un fragmento de 1400 pb que fue utilizado como sonda para Northern Blot.



*pcDNA3-T-bet:*

La construcción pJG4.5mT-bet fue generosamente cedida por la Dra Laurie H. Glimcher (Szabo et al., 2000). pJG4.5mT-bet fue digerido usando la enzima *NotI* para obtener un fragmento de 2500 pb que fue posteriormente subclonado en el vector pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para obtener el vector de expresión de T-bet murino (pcDNA3-T-bet), como se detalla en el siguiente apartado. Además se utilizó un fragmento de DNA de 1100 pb obtenido por digestión enzimática con *BamHI* como sonda para los ensayos de Northern Blot.

*pcEFL-p38 $\beta$ :*

El vector de expresión de la subunidad  $\beta$  de la MAPK p38 murina, fue generosamente cedido por el Dr Omar Cosso.

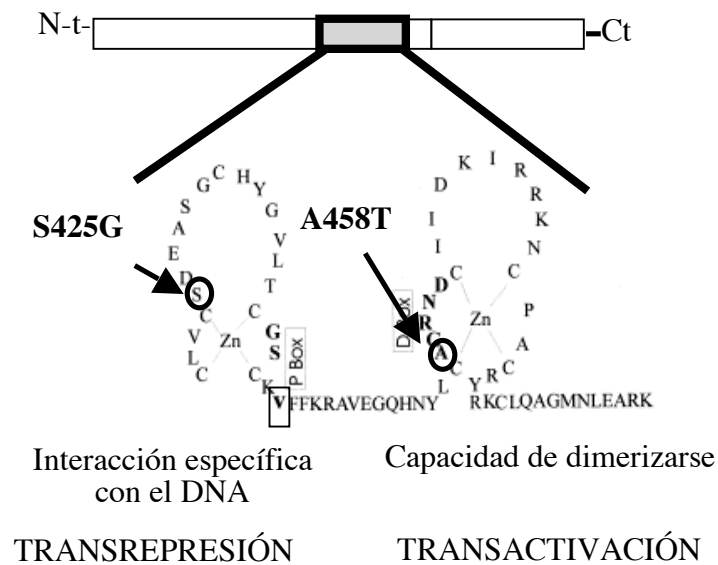
*dn-I $\kappa$ B:*

El vector de expresión que codifica para la proteína dominante negativa de I kappa B fue gentilmente cedida por el Dr. EB Traencker (Traenckner et al., 1995).

*phGR-SB, A458T y S425G:*

El receptor de glucocorticoides humano salvaje (phGR-SB) y las mutantes derivadas de mutaciones puntuales en el sitio de unión al DNA (DBD), A458T y S425G fueron gentilmente cedidas por el Dr. Andrew C.B. Cato (Heck et al., 1994).

S425G es una mutante del dominio de unión al DNA (DBD) del GR (tiene mutada una serina por una glicina en la posición 425 del primer dedo de zinc del GR) que se ha demostrado que bloquea la transrepresión de NF- $\kappa$ B (Tao et al., 2001) y A458T es una mutante de la interfase D-loop de dimerización del GR (tiene mutada una alanina por una tirosina en la posición 458 del segundo dedo de zinc del GR) que bloquea la dimerización del GR y la activación de la transcripción (Tao et al., 2001) (Fig. 14). Por lo tanto se considera que S425G es una mutante de transrepresión y A458T es una mutante de transactivación. Ambas mutantes constituyen herramientas importantes para estudiar el mecanismo molecular implicado en las acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras de los GC.



**Figura 14: Estructura y mutantes del GR.** Secuencia aminoacídica de los residuos del GR, mostrando los dos motivos de dedos de zinc. Los 3 aminoácidos en negro del primer dedo de zinc (P Box) son esenciales para la discriminación entre GRE y ERE, mientras que los aminoácidos en negro del segundo zinc finger (D Box) son importantes para la interacción proteína-proteína en el complejo dimérico DBD:GRE. S425G es una mutación en el DBD de una serina por una glicina que bloquea la transrepresión de NF- $\kappa$ B. A458T es un mutación en la interfase de dimerización de una alanina por una treonina que bloquea la dimerización del GR y la activación de la transcripción.

### III.7.2. Subclonados realizados

#### IFN- $\gamma$ Luc:

El reportero del promotor de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ Luc) fue construido como se detalla a continuación: Se utilizó el DNAC de pUC-IFN- $\gamma$  acoplado al gen de cloranfenicol acetil transferasa como molde y se liberó el fragmento correspondiente al DNAC de IFN- $\gamma$  cortando con las enzimas *Sma*I (que deja extremos romos) y *Hind*III (que deja extremos cohesivos). El fragmento fue purificado por gel (low melting) y luego el DNAC de IFN- $\gamma$  se mezcló con el vector pGL3-Basic previamente cortado y linealizado con *Sma*I y *Hind*III y se realizó la reacción de ligación. La correcta inserción fue verificada utilizando las enzimas de restricción *Not*I (linealiza la construcción dando lugar a una única banda de 8344 pb) y *Nco*I (corta en dos lugares dando dos bandas, una de 1344 pb y otra de 7000 pb) y corriendo los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y un marcador de peso

molecular. La reacción de ligación se realizó a 20°C durante 18 hs, en 20  $\mu$ l de buffer de ligación conteniendo Tris-HCl (50 mM), pH:7.5; MgCl<sub>2</sub> (7 mM); DTT (1 mM), en presencia de rATP (500  $\mu$ M) y DNA ligasa del fago T4 (1 U) (Stratagene, Heidelberg, Alemania).

#### *pcDNA3-T-bet:*

El vector de expresión de T-bet (pcDNA3-T-bet) fue construido como se detalla a continuación:

Se utilizó el DNAc de la construcción pJG4.5mT-bet (pJG4.5 es un vector de expresión de levaduras) como molde y se digirió usando la enzima *NotI* para obtener un fragmento de 2500 pb de extremos cohesivos que corresponde al fragmento entero clonado de T-bet. El fragmento fue purificado por gel y luego el cDNA se mezcló con el vector pcDNA3 previamente cortado con *NotI* (da lugar a un plásmido lineal de 5400 pb). A continuación el plásmido fue purificado y desfosfateado y se realizó la reacción de ligación. Así se obtuvo el vector de expresión de T-bet murino (pcDNA3-T-bet). La correcta inserción fue verificada utilizando las enzimas de restricción *EcoRV* y *SmaI* que dan lugar a los siguientes fragmentos si T-bet ingresa orientado en el sentido correcto: 4500, 1900, 1100 y 400 pb aproximadamente.

#### *T-bet-RE-Luc:*

Para construir el reportero T-bet-RE-Luc primero se anillaron los oligonucleótidos doble cadena que codifican para la sitios de unión de T-bet. Para ello se pusieron a anillar 20  $\mu$ g de cada uno de los oligos. Se agregó el buffer de annealing 10 X (TRIS-HCl, pH:7,5, 500 mM; Cl<sub>2</sub>Mg, 100 mM; Espermidina, 10 mM; DTT 50 mM) y se llevó a volumen con agua miliQ. Se incubó a 85°C durante 5 min. Luego se apagó el baño y se dejó que la temperatura baje a 40°C lentamente. Se dejó en la heladera a 10°C durante toda la noche y luego se guardaron los oligos anillados y alicuotados a -20°C. Los oligos anillados fueron posteriormente rellenados usando la enzima klenow junto con dNTPs y el buffer correspondiente a dicha enzima, dando lugar a la formación de extremos romos. A su vez, se cortó el vector pGL3-Basic usando la enzima *SmaI*, se corrió el vector linealizado en un gel 1 % agarosa con bromuro de etidio y se purificó el fragmento usando el kit QUIAEX<sup>®</sup>. El vector luego fue cuantificado por gel con marcadores de masa y posteriormente desfosfateado usando la enzima SAP (Shrimp alkaline phosphatase) y su buffer correspondiente durante 2 hs a 37°C y luego 20 min a 65°C. Por último se realizó la

reacción de ligación como fue indicado con anterioridad. La correcta inserción fue verificada posteriormente por secuenciación

### **III.7.3. Manejo de Plásmidos**

#### *III.7.3.1. Preparación de Bacterias Competentes*

Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  fueron utilizadas como fuente de bacterias competentes. Para alcanzar la competencia, las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar libres de antibiótico suficientemente diluídas como para obtener colonias individuales, e incubadas a 37°C por 16 hs. Una colonia fue picada y crecida durante 16 hs en 5 ml de medio LB en agitación (200 rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación, se inocularon 200 ml del LB nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 medida a 600 nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y el pellet bacteriano se resuspendió en 100 ml de cloruro de calcio 100 nM pre-enfriado en hielo. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000 rpm. El pellet fue resuspendido en 5 ml de cloruro de calcio 100 nM e incubado en hielo por 30 min. Posteriormente 200  $\mu$ l de la suspensión de bacterias fueron alicuotadas en tubos eppendorf con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 15 %. Finalmente las bacterias fueron conservadas a -80°C.

#### *III.7.3.2. Transformación Bacteriana y Aislamiento de Plásmidos*

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook y Russell, 2001) modificado a partir del original de Hanahan (Hanahan, 1983).

50-100  $\mu$ l de bacterias competentes DH5 $\alpha$  de eficiencia al menos  $1 \times 10^6$  colonias/ml, almacenadas a -80°C fueron descongeladas lentamente en hielo granizado. Una vez que se descongelaron se agregaron entre 50 ng y 1  $\mu$ g de plásmido, y se las incubó 30 min en hielo. Luego se les aplicó un shock térmico de 90 seg a 42°C y nuevamente se las colocó en hielo. Luego se agregaron 700  $\mu$ l de medio LB sin antibiótico durante 45-60 min a 37°C. Finalmente, se tomaron cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500  $\mu$ l), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquearon en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

### *III.7.3.3. Preparación de Plásmidos a Pequeña Escala o Minipreparaciones*

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979). Tubos de vidrio conteniendo 3 ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés, aisladas como se describió previamente en placas en LB agar. Los cultivos fueron mantenidos por 20 hs aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm. Luego, 1.5 ml de cultivo fueron trasvasados a tubos tipo eppendorf y centrifugados a 2000 rpm 5 min. El pellet celular fue resuspendido en 300  $\mu$ l de P1 (Tris-HCl 50 mM, pH:7.5; EDTA 10 mM) conteniendo RNasa A (50  $\mu$ g/ml). Luego 300  $\mu$ l de P2 (NaOH 0.2 N; SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 300  $\mu$ l de P3 (KAcO 3M, pH:5.2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. 700  $\mu$ l del sobrenadante fueron precipitados con un volumen de isopropanol, y el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70%. El pellet finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua.

### *III.7.3.4. Chequeo de Plásmidos por Enzimas de Restricción*

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron chequeados mediante mapeos por enzimas de restricción para asegurar la utilización de los plásmidos correctos. Para ello varias minipreparaciones de DNA plasmídico fueron chequeadas simultáneamente. 2-3  $\mu$ l de DNA plasmídico proveniente de minipreparaciones fue sometido a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: 2-3  $\mu$ l de DNA plasmídico, 2  $\mu$ l de buffer de restricción, 0.5 U de la enzima de restricción escogida y agua hasta completar 20  $\mu$ l de volumen final. Las mezclas fueron incubadas durante 2 hs a 37°C. Luego las bandas obtenidas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa de entre 0.6-2 % en buffer TBE (Tris-HCl 25 mM; Acido Bórico 100 mM; EDTA 10 mM, pH:8.0) con bromuro de etidio. El porcentaje final de agarosa de los geles fue determinado según el tamaño de las bandas esperadas. Finalmente las bandas fueron puestas de manifiesto mediante exposición a luz UV y documentadas fotográficamente en papel térmico.

### *III.7.3.5. Preparación de Plásmidos a gran Escala o Maxi-Megapreparaciones*

Aquellos plásmidos chequeados fueron sujetos a amplificaciones a gran escala con el objeto de obtener una masa suficiente como para llevar adelante los experimentos de transfecciones. Para ello las maxipreparaciones fueron llevadas a cabo mediante el uso de columnas de afinidad (QIAGEN, Hylden, Alemania). Brevemente, 350 ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado para la selección, fueron inoculados con una alícuota de bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés, aisladas como se describió previamente en placas en LB agar. Los cultivos fueron mantenidos por 20 hs aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm. Los cultivos en fase logarítmica de crecimiento fueron trasvasados a botellas de policarbonato de 500 ml y fueron centrifugados a 6000 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet celular fue resuspendido en 10 ml de P1 (Tris-HCl 50 mM, pH:7.5; EDTA 10 mM) conteniendo RNAsa A (50  $\mu$ g/ml). Luego 10 ml de P2 (NaOH 0.2 N; SDS 1 %) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron otros 10 ml adicionales de P3 (KAcO 3 M, pH:5.2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 20.000 xg durante 10 min a 4°C. Mientras las columnas se equilibraron con buffer QBT. El sobrenadante fue filtrado en un embudo con gasa y volcado en una columna QIAGEN-tip 500 (para maxipreparaciones) o tip-2500 (para megapreparaciones). La columna fue vaciada por gravedad y lavada dos veces con 30 ml de buffer de lavado QC. Finalmente el DNA atrapado en la columna fue eluído con 15 ml buffer de elución QF. El DNA del eluato fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol en tubos COREX y centrifugado a 15000 xg. El DNA precipitado fue lavado dos veces con etanol 70 % y el pellet fue secado al aire durante 20 min y resuspendido en 300  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. La calidad del DNA plasmídico se verificó por geles de agarosa y la concentración final se midió por espectrofotometría.

### *III.7.3.6. Purificación de fragmentos de ADN*

Los fragmentos obtenidos por la digestión enzimática de plásmidos fueron separados mediante la purificación por gel. Para ello se corrió electroforéticamente el producto de la digestión en un gel conteniendo 1-1,5 % agarosa de bajo punto de fusión (low melting point) disuelta en buffer TBE (Tris-HCl 25 mM, Borato 100 mM; EDTA 10 mM, pH: 8.0) conteniendo bromuro de etidio a 80V. Para identificar el tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb. Las muestras se sembraron en un buffer conteniendo un 20 % de

Glicerol y Azul de Bromofenol como colorante indicativo del frente de la corrida. Las bandas se visualizaron utilizando luz ultravioleta de 254 nm. Los fragmentos de agarosa conteniendo las bandas de interés se recortaron utilizando un bisturí y se transfirieron a un tubo eppendorf. Luego se calentaron a 70°C por 20 min. A la agarosa derretida se le agregó un volumen de fenol y un décimo del volumen de cloroformo. Se enfrió rápidamente en hielo por 15 min y se centrifugó a 10000 g por 15 min, el sobrenadante se transvasó a otro eppendorf y luego de dos lavados con cloroformo, se precipitó con un volumen de isopropanol y un décimo de acetato de sodio (3 M), luego de la centrifugación a 10000 g el precipitado se lavó con etanol, se volvió a precipitar por centrifugación, se secó con aire caliente y se resuspendió en agua. Una alícuota del DNA fue luego cuantificado utilizando un espectofotómetro y se guardó a -20°C para su posterior utilización.

Por este método se obtuvo el fragmento de 3400 pb correspondiente al DNAC del promotor de IFN- $\beta$  para su clonado en pGL3-Basic como se detalló anteriormente. Este mismo método se utilizó para el subclonado del fragmento de 2500 pb de T-bet en el vector de expresión pcDNA3 y la sonda de DNA de 1100 pb utilizadas para la detección de la expresión específica por la técnica de Northern Blot. Las sondas de DNA utilizada para la detección de la expresión de GATA-3 de 1400 pb y la de  $\beta$ -actina de 1000 pb también fueron obtenidas por el mismo método.

#### *III.7.3.6.1. Marcación de Sondas: Método de extensión del primer*

Las marcaciones de los fragmentos se realizaron el método de random-primer y extensión con un kit de marcación Boehringer (Ingelheim, Alemania).

Para esto se desnaturalizó 50 ng del fragmento a marcar disuelto en agua mediante calentamiento a 100°C por 10 min y enfriamiento rápido a 4°C. Luego se le agregó el buffer de reacción 10X (2  $\mu$ l) conteniendo hexanucleótidos, 3  $\mu$ l de una mezcla de dNTP (conteniendo 0.5M de dATP, dTTP, dGTP) y 5  $\mu$ l de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-dCTP (10  $\mu$ Ci/ml, 3000 Ci/mol). Se le agregó luego el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (2U) y se incubó a 37°C por 1h. Los hexanucleótidos contenidos en el buffer funcionan como primers inespecíficos y mediante la extensión de la cadena por la enzima se incorpora el nucleótido marcado radiactivamente.

Se obtuvieron entonces productos marcados radiactivamente de tamaños diversos complementarios al DNA utilizado como molde. Para separar los productos de mayor tamaño de los de menor tamaño (que pueden dar señales mas inespecíficas) se utilizó el método de cromatografía por centrifugación. Para esto se realizaron columnas conteniendo sefadex G50

en buffer TES (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH:7) en jeringas de 1ml y se cargó el producto de la marcación disuelto en buffer TES. Luego de la centrifugación se obtuvo una primera fracción (con los productos grandes) que fue la utilizada en la reacción de hibridación. La eficiencia de la marcación se determinó mediante el conteo de la radiactividad incorporada al DNA utilizando un contador  $\beta$  Beckman (Beckman Coulter Inc, Fullerton, EUA) que debe ser  $2-4 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g DNA y por la relación entre la primera y una segunda fracción obtenida por una segunda centrifugación luego de cargar la columna con buffer TES la cual debe ser igual o mayor a 10. La sonda marcada se guarda luego a  $-20^\circ\text{C}$  para su posterior utilización.

### III.7.4. Análisis del RNAm por ensayos de Northern Blot

#### III.7.4.1. Extracción del RNAm

Se utilizó el método de isotiocianato de guanidina y fenol-cloroformo (Arzt et al., 1992). Una vez terminado el tiempo de estimulación de las células en cultivo, el contenido de cada pocillo fue colocado en un eppendorf de 2 ml libres de RNAsas. Las células fueron pelleteadas por centrifugación a 2000 rpm durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ . Luego se lavaron con PBS y se les agregó 900  $\mu$ l de solución D (isotiocianato de guanidina 4M; citrato de sodio 25 mM, pH:7; N-lauril-sarcosil 0.5%; 2-mercaptoetanol 0.1 M) por pocillo de placa de 6, que es un buffer de lisis que protege al RNA liberado de la acción de las RNAsas celulares. A el lisado se le agregó sucesivamente 90  $\mu$ l de acetato de sodio 2 M (pH:4) para favorecer la precipitación, 100  $\mu$ g de glucógeno como carrier, 900  $\mu$ l de fenol y 180  $\mu$ l de cloroformo-isoamílico (49:1). Se mezclaron utilizando un vortex durante 15 segundos, manteniendo la mezcla en hielo durante 30 minutos. Luego se centrifugó por 20 min a 10000 rpm utilizando una centrifuga refrigerada. Se tomó luego la fase acuosa superior conteniendo al RNA total y se precipitó luego con un volumen de isopropanol por un mínimo de 2 hs a  $-20^\circ\text{C}$ . Se centrifugó nuevamente por 30 min a 10.000 rpm y el precipitado de RNA se resuspendió en 300  $\mu$ l de solución D mas 300  $\mu$ l de isopropanol, se incubó nuevamente a  $-20^\circ\text{C}$  por un mínimo de 2 hs y luego de una nueva centrifugación el precipitado se lavó con 300  $\mu$ l de etanol al 75%; se lo secó y resuspendió en 25  $\mu$ l de agua previamente libre de RNAsas por autoclavado en presencia de dietilpirocarbonato (DEPC). El RNA resuspendido en agua puede guardarse a  $-20^\circ\text{C}$ .

Para la cuantificación del RNA se utilizó una dilución 1/100 de la muestra en agua (DEPC) y se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. La pureza de las muestras se determinó mediante el índice



de absorbancia a 260/280 nm. Una relación de 1,8-2 de este índice es indicativo de una alta pureza del RNA obtenido.

Previamente a la realización de la reacción de transcripción reversa o de los ensayos de Northern Blot, la calidad y cantidad relativa de las muestras fue chequeada mediante electroforesis a 30 V/cm en geles de agarosa 1 % en buffer TBE 1X teñidos con bromuro de etidio. Solo fueron utilizadas aquellas muestras que no mostraron ningún grado de degradación.

#### *III.7.4.2. Electroforesis del RNA por el método de glioxal*

Se utilizó el método de glioxalización de las muestras que consiste en incorporar a la cadena de RNA covalentemente pequeñas moléculas de glioxal, de esta forma la corrida electroforética puede realizarse en condiciones no desnaturalizantes (en ausencia de formaldehído).

Para esto 20 µg del RNA (llevados a 18 µl con agua DEPC) se incubaron con 1 µl de una solución de glioxal (127 µl de glioxal deionizado; 1 µl de buffer fosfato de sodio 1M) y 24 µl de DMSO a 50°C por 1 h. Luego se le agregaron 4 µl de buffer de siembra (azul de bromo fenol 0.25 %; xilen-cianol 0.25 %, Glicerol 50%). Estas muestras se sembraron en un gel 1,2 % de agarosa en buffer fosfato (fosfato de sodio 10mM). La corrida electroforética se realizó a 130 V y 80-120 mA por 4-6 hs en buffer de corrida fosfato de sodio 10 mM pH 6.5. Durante la corrida el buffer se hizo recircular mediante una bomba con el fin de mantener las condiciones de corridas homogéneas. Cuando el frente de corrida (azul de bromo fenol) llegó al borde del gel se procedió a realizar la transferencia.

#### *III.7.4.3. Transferencia del RNA a una membrana de Nylon*

Al finalizar la electroforesis, el RNA fue transferido a una membrana de nylon (Hybond-N; Amersham Life Science, Freiburg, Alemania). Para ello se colocó el gel en contacto con la membrana de nylon previamente hidratada se utilizó la transferencia por capilaridad durante 18 hs utilizando una solución 20 X SSC (NaCl 3M; citrato de sodio 0.3M). Luego las membranas transferidas se fijaron por calor a 80°C durante 2 hs y se trataron con ácido acético por 15 min. Luego se visualizó la integridad de RNA por tinción con azul de metileno en una solución de acético 0.04 % y posterior lavado con agua. La visualización de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28 S y 18 S se utilizó como indicativo de la integridad del RNA total

corrido. Luego las membranas son guardadas a 4°C para la posterior detección por hibridización con sondas radiactivas de la expresión de genes específicos.

#### *III.7.4.4. Hibridización con sondas radiactivas*

Para la detección en las membranas de nylon de los niveles de expresión de genes específicos se utilizó la hibridización por complementaridad utilizando para ello las sondas radiactivas. Las membranas fueron prehibridizadas por un mínimo de 2 hs a 42°C, en una solución de prehibridización para bloquear los sitios inespecíficos (SSPE 5X, formamida 50 %, Denhardt's 5X, DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado 0.1 mg/ml y SDS 0.1 %, SSPE 20 X, NaCl 3.6 M, buffer fosfato de sodio 0.2 M, EDTA 20 mM, Denhardt 100 X, albúmina bovina (BSA) 2 %, Ficoll 2 %, Polivinilpirrolidona 2 %). Se agregó luego la sonda marcada previamente 10.000 cpm/cm<sup>2</sup> de membrana y se hibridizó durante toda la noche 42°C. Utilizamos las sondas descritas anteriormente de T-bet, GATA-3 y  $\beta$ -actina.

Finalizada la hibridización se procedió a realizar lavados sucesivos en condiciones de astringencia cada vez mayores con el objetivo de liberar la radiactividad incorporada inespecíficamente en la membrana. Los lavados fueron: 2 de 15 min a temperatura ambiente (2X SSC, SDS 0.1 %); 30 min a 42°C (1 x SSC, SDS 0.1 %), 15-30 min a 42-60°C (0.1 X SSC, SDS 0.1 %), dependiendo de la sonda utilizada. Los filtros se expusieron con placas intensificadoras en cuarto oscuro a la película autorradiográfica (Kodak-XOMAT, Sigma, MO, EUA). La exposición se realizó a -80°C por el tiempo necesario para tener una señal apreciable. Las placas autorradiográficas resultantes de la hibridación de los Northern Blots fueron digitalizadas y se midió la intensidad de cada banda. El análisis se realizó utilizando el programa de análisis de geles NIH image. Los datos resultantes de la hibridización con las distintas sondas de los genes de interés T-bet y GATA-3, fueron normalizados con respecto a la banda de  $\beta$ -actina y expresados como unidades densitométricas relativas.

#### *III.7.4.5. Lavado de las membranas de nylon para su reutilización posterior*

Para reutilizar las membranas ya utilizadas, y volver a hibridizar con otra sonda distinta luego de que se le despegue la sonda anterior, se utilizó una solución conteniendo (Denhardt 5 X, Tris-HCl 20 mM, EDTA 20 mM pH: 8.0) y se incubó la membrana durante 2 hs a 80°C. Se comprobó luego el correcto lavado de la sonda por autorradiografía. Las membranas pueden ser reutilizadas luego para la hibridización con una segunda sonda y así sucesivamente.

### III.7.5. Análisis del RNAm por PCR

#### III.7.5.1. Transcripción Reversa

Para la síntesis de DNA complementario a partir del RNA extraído, el RNA contenido en 5  $\mu$ l fue desnaturalizado a 65°C por 5 min, incubado a 0°C por 2 min y mezclado con 15  $\mu$ l de una solución “Mix” conteniendo Tris-HCl 50 mM pH:7.3; KCL 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 10 mM, 20 U de RNAsin (Promega, Madison, WI, EUA), dNTPs 400  $\mu$ M, Oligo dT 2.5  $\mu$ M y 300 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente por 10 min, luego a 35°C durante 60 min y finalmente la enzima fue desnaturalizada durante 95°C durante 5 min.

#### III.7.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa

##### *Amplificación del RNAm de T-bet, GATA-3 y $\beta$ -actina, PCR semicuantitativa*

La extracción del RNA total de esplenocitos (para la medición de la expresión y para los ensayos de medición de degradación con actinomicina D del RNAm de T-bet y GATA-3) y de la línea celular EL-4 transfectadas con los vectores de expresión de T-bet y GR (para los ensayos de CHIP) que se detallan más abajo, y la transcripción reversa fue llevada cabo como se describe en los puntos anteriores. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en el buffer suministrado por el proveedor de Taq polimerasa en presencia de Cl<sub>2</sub>Mg 1.5 mM, dNTPs 25 mM, primers a una concentración final de 1.25  $\mu$ M y 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa. Siempre se incluyeron controles sin DNAc molde y el volumen final de la reacción fue de 50  $\mu$ l. Luego de una breve incubación de desnaturalización de 5 min a 95°C se realizaron 25 ciclos con las siguientes características:

Desnaturalización: 1 min a 95° C

Anillado: 1 min a 57, 56, 67, ° C (para T-bet, GATA-3 y  $\beta$ -actina respectivamente).

Elongación: 1:30 min 72° C

Estas condiciones fueron estandarizadas por ofrecer la mejor linealidad para la reacción y la mejor correlación entre la cantidad de DNAc presente en la muestra y la intensidad de las bandas.

El mensajero de actina fue elegido como gen *housekeeping* de control interno de carga y fue amplificado a partir de las mismas muestras y bajo las mismas condiciones de reacción.

Los primers utilizados fueron los siguientes:

T-bet: (forward):5'-GCCAGGGAACCGCTTATATG-3'  
(reverse):5'GACGATCATCTGGGTCACATTGT-3'

β-actina: (forward): 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'  
(reverse): 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG -3'

GATA-3: (forward):5'-CTACCGGGTTCGGATGTAAGTC -3'  
(reverse):5'-GTTACACACTCCCTGCCTTCT -3'

### III.7.5.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

Los productos que fueron sujetos a PCR en tiempo real fueron los obtenidos del tratamiento de los cultivos primarios de esplenocitos de ratón con Dex con el objetivo de tener un dato cuantitativo de la inhibición de la expresión del RNAm de T-bet y GATA-3 y asimismo para estudiar si los GC afectan la estabilidad de dichos mensajeros. La mezcla fue esencialmente la misma que para las PCR anteriormente descritas con pero con el agregado de Cybergreen (0.02 μl por reacción de una solución de trabajo 1/30 en DMSO) y una concentración final de Cl<sub>2</sub>Mg 5 mM. Para la puesta a punto de cada primer se realizó una curva de anillado en la cual se llevaron a cabo simultáneamente 6 reacciones con diferentes temperaturas de anillado en una misma corrida. Luego se eligió la adecuada para cada primer. En el caso de la PCR en tiempo real es un requisito indispensable obtener un único producto que correlacione con un único pico de fluorescencia detectado por el termociclador. La obtención de un único pico así como la forma final de ese pico dependen críticamente de una serie de factores como la concentración de Cl<sub>2</sub>Mg, la temperatura de anillado, la calidad del DNAc y secuencia de los primers. Así, 3 pares de primers que anillan en distintas regiones exónicas de T-bet, GATA-3 y β-actina con las siguientes secuencias fueron evaluados:

T-bet: (forward):5'-GCCAGGGAACCGCTTATATG-3'  
(reverse):5'GACGATCATCTGGGTCACATTGT-3'

GATA-3: (forward):5'-CTACCGGGTTCGGATGTAAGTC -3'  
(reverse):5'-GTTACACACTCCCTGCCTTCT -3'

β-actina: (forward): 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'  
(reverse): 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG -3'

Todos ellos dieron un pico único en la PCR de tiempo real y fue el que se utilizó para los estudios de expresión del mensajero.

Para las PCR se utilizaron ciclos con las siguientes características:

- 1- 95°C por 10 min
- 2- 95°C por 30 seg.
- 3- 57°C o 67°C o 56°C por 1 min (para T-bet o actina o GATA-3 respectivamente)
- 4- 72°C por 1 min
- 5- 78°C por 2 seg.
- 6- leer placa
- 7- ir al paso 2 35 veces
- 8- 65 °C 1 min
- 9- curva de melting: de 65°C a 95°C, leer cada 0.3°C, 8 segundos
- 10- Incubar a 4°C 15 hs.

La intensidad de fluorescencia fue graficada en función de los ciclos utilizando un algoritmo provisto por los fabricantes.

#### *III.7.5.3.1. Ensayos de estabilidad del RNAm*

Los cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron tratados con Con A (2.5 µg/ml) durante 16 hs y luego pretratados con actinomicina D durante 2 hs. Posteriormente se cosecharon las células y se aisló el RNAm inmediatamente (tpo: 0) y a los siguiente tiempos post-tratamiento con actinomicina D: 45 y 90 min, 3 y 5 hs en ausencia y en presencia de Dex 100 nM. La estabilidad del mensajero de T-bet y GATA-3 fue analizado usando la técnica de PCR en

Tiempo Real para cuantificar la abundancia del RNAm en cada punto relativo a la abundancia del RNAm a tpo: 0.

### III.7.6. Western Blot

#### III.7.6.1. Obtención de extractos celulares

EL contenido de cada pocillo de una placa de 6 pocillos con células 75-80 % de confluencia, fueron trasvasadas a tubos eppendorf en hielo. Luego de una centrifugación leve a 2000 rpm, 5 min a 4°C, las células fueron lavadas con PBS frío, centrifugadas nuevamente y el pellet celular fue lisado con loading buffer 2 X (Tris Hcl 125 mM, pH:6.8, SDS 2 %, glicerol 25 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.7 M, azul de bromofenol 0.01 %). En los casos en los cuales la ruptura de la membrana nuclear generó la formación de un fracción mucoide, producto de la liberación DNA, que impide el sembrado de las muestras, las mismas fueron sometidas a un tratamiento de sonicación mediante el cual se les aplicó 1-3 pulsos de ultrasonido a 10% de intensidad máxima de 5 seg de duración. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior utilización.

#### III.7.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), electrotransferencia y revelado

La fracción alicuotada y guardada a -80°C fue corrida en geles de poliacrilamida 10 % desnaturalizante en buffer tris-glicina-SDS 1X (Tris 25 mM, pH:8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1 %). Se utilizó para la identificación de los tamaños moleculares el marcador de peso molecular "Broad Preshion Marker" (Bio Rad, Hercules, CA). Una vez realizada la corrida electroforética se realizó la electrotransferencia a 100 V por 1 h en buffer de transferencia (Tris 25 mM, pH:8.3; glicina 192 mM; SDS 0.05 %; metanol 20 %) utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0.4  $\mu$ M de poro.

Una vez obtenidas las membranas se procedió a teñirlas transitoriamente con Rojo Ponceau para controlar la equivalencia en las masas sembradas en cada calle. Previamente a la reacción de detección se bloquearon los sitios inespecíficos de las membranas incubándolas durante 2 hs en agitación con una solución conteniendo: Tris 25 mM, pH:8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1 %; leche descremada 5 %; Tween 20 0.05 X y se agregó como primer anticuerpo en una dilución en el mismo buffer de bloqueo, uno de los siguientes:

IgG monoclonal de ratón anti T-bet de ratón (100 ng/ml).

IgG monoclonal de ratón anti GATA-3 de ratón (100 ng/ml).

IgG monoclonal de ratón anti GAPDH de ratón (dilución: 1:10000) (Abcam Inc, Cambridge, UK) usado de rutina como control de carga.

Para los ensayos de señalización y fosforilación de GATA-3, se utilizó uno de los siguientes:

IgG monoclonal de conejo anti P-p38 de ratón (dilución: 1:1000).

IgG monoclonal de conejo anti p-38 total de ratón (dilución: 1:1000).

IgG monoclonal de conejo anti p-treonina total de ratón (dilución: 1:1000).

IgG monoclonal de ratón anti p-serina de ratón y humano (dilución: 1:1000).

Luego se realizaron 4 lavados sucesivos por 5 min cada uno con una solución conteniendo: Tris 25 mM, pH:8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1%; Tween 20, 1X y se procedió a incubar con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa en una dilución 1:3000 en buffer de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Luego de tres lavados sucesivos con: Tris 25 mM, pH:8.3; glicina 192 mM; SDS 0.1%; Tween 20, 0.1X y un cuarto lavado con buffer libre de Tween: Tris 25mM, pH:8.3, glicina 192 mM, SDS 0.1%, 0.1X, las bandas fueron detectadas mediante la utilización de un kit de detección de quimioluminiscencia (SuperSignal<sup>®</sup> West Dura, PEARCE, Rockford, IL, EUA) y reveladas mediante exposición a placas radiográficas.

### **III.7.7. Ensayos de coimmunoprecipitación**

Los ensayos de coimmunoprecipitación se realizaron para analizar la interacción de T-bet/GATA-3 con GR (o la mutante S425G), y para los ensayos de señalización y fosforilación de GATA-3, transfectados exógenamente en la línea celular EL-4. También se analizó la interacción de T-bet y GR expresados de manera endógena en los cultivos primarios de esplenocitos de ratón enriquecidos en la expresión de T-bet. Tanto la línea EL-4 transfectada como los cultivos diferenciados fueron estimulados bajo condiciones activantes (PMA y ionomicina para T-bet y AMPc para GATA-3) y en presencia de Dex durante 30 min o 1h.

Se obtuvieron los extractos y se inmunoprecipitaron como fue descrito con anterioridad (Paez-Pereda et al., 2003). Para obtener los extractos, las células fueron cosechadas usando un buffer de lisis que contiene: Tris-Hcl 50 mM, pH 7.4; EGTA 1 mM; NP-40 1%; ClNa 150 mM; orthovanadate 2 mM; phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM; Protease Inhibitor Cocktail

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Luego el extracto fue inmunoprecipitado usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-T-bet o anti-GATA-3 y un anticuerpo policlonal de conejo anti-GR (1  $\mu$ g/ml). El extracto inmunoprecipitado fue corrido en geles de poliacrilamida 10 % desnaturizante y luego electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa de 0.4  $\mu$ M de poro. Las membranas luego fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos (T-bet, GATA-3 o GR) y la señal se detectó con fue descripto con anterioridad. La Dex fue agregada durante 30 minutos o 1 h de incubación y luego se realizó el ensayo de co-inmunoprecipitación entre T-bet o GATA-3 y GR.

### III.7.8. Ensayos de retardo en gel (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Los ensayos de EMSA fueron realizados como fue descripto con anterioridad (Costas et al., 1996). Para ello la línea celular EL-4 fue transfectada con los vectores de expresión de T-bet/GATA-3 y el vector de expresión de GR y estimuladas con PMA (0.1  $\mu$ M), ionomicina (1  $\mu$ M) y AMPc según corresponde, en presencia o ausencia de Dex 100 nM, durante 1 y 6 hs. Luego las células fueron cosechadas y lavadas con PBS frío. Para obtener los extractos proteicos nucleares las células fueron lisadas en 100  $\mu$ l de Buffer A (Hepes 10 mM, pH:7.9; KCl 10 mM; EDTA 100  $\mu$ M; NP-40 0.1%; Cocktail inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)). Luego de centrifugar, el precipitado nuclear fue lisado con 20  $\mu$ l de Buffer B (Hepes 20 mM, pH:7.9; NaCl 0.42 M; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM).

Se utilizaron oligonucleótidos doble cadena codificantes para los sitios de unión de T-bet y de GATA-3:

T-bet:	forward:	5'- GTGAATTTACACCTAGGTGTGAAATT-3'
	reverse:	5'-AATTTACACCTAGGTGTGAAATT-3'
GATA-3:	forward:	5'-CACTTGATAACAGAAAGTGATAACTCT-3'
	reverse:	5'-GTGAACTATTGTCTTTCACTATTGAGA-3'

Estos oligos doble cadena fueron marcados en sus extremos usando [ $^{32}$ P]ATP y T<sub>4</sub> polynucleotide kinase. Se incubaron cantidades iguales (20  $\mu$ g) de cada muestra en un volumen final de 20  $\mu$ l de buffer que contiene 500 o 1000 ng de poly (dI-dC)(dI-dC). Los ensayos de competencia específica se realizaron agregando los fragmentos de DNA que corresponden a



los sitios de unión de T-bet o de GATA-3 radioinertes 500 veces en exceso molar. Luego de incubar en hielo durante 10 min, se agregaron los oligonucleótidos marcados en sus extremos (20.000 cpm), y se continuó incubando durante 20 min a temperatura ambiente. Los ensayos de Supershift fueron realizados utilizando 1  $\mu$ g de los anticuerpos anti-T-bet o anti-GATA-3 específicos. Los complejos entre DNA y proteína fueron resueltos en un gel 5 % de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Los resultados fueron visualizados por autorradiografía de los geles secos y la cuantificación se realizó con un Phosphoimager utilizando el programa Image Gauge v 3.1 y ratificada utilizando el programa NIH-image.

### **III.7.9. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, Chromatin Immunoprecipitation)**

Para los ensayos de ChIP se utilizó la línea celular EL-4 transfectada transientemente con los vectores de expresión de T-bet y GR. Estas células fueron estimuladas bajo condiciones activantes utilizando PMA y ionomincina en presencia o ausencia de Dex 100 nM durante 1 o 6 hs. A continuación se realizó el *crosslinking* de las proteínas al DNA utilizando formaldehído 1 % durante 10 min a 37°C, lavadas con PBS y lisadas primero con un buffer de lisis citoplasmático (Hepes 50 mM, pH:8; EDTA 1 mM; EGTA 0.5 mM; NaCl 140 mM; Glicerina 10 %; NP-40 0.5 %; Triton X 100, 0.25 %) durante 10 min en hielo y luego durante 1 h con un buffer de lisis nuclear (Tris-HCl 10 mM, pH:8; EDTA 1 mM; EGTA 0.5 mM; ClNa 200 mM). La cromatina fue fragmentada en pedazos de 500 pb de longitud promedio por sonicación en hielo utilizando tres pulsos de 10 segundos y 30 % de amplitud (Fisher Scientific Sonic Dismembrator, Troy, NY). A aproximadamente un 1 % de esta solución se guardó para ser utilizada como input DNA. Luego se realizó una inmunoprecipitación como las descritas con anterioridad. Previamente se pre-trató la cromatina con bolitas de proteína-A-sepharosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) durante 2 hs a 4°C con rotación para disminuir el pegado inespecífico. Se centrifugaron las muestras y los sobrenadantes se incubaron durante toda la noche, utilizando el anticuerpo de ratón monoclonal anti-T-bet (1  $\mu$ g). A continuación se agregaron nuevamente durante 4 hs bolitas de proteína-A-sepharosa. La fracción inmuoprecipitada fue lavada 5 veces con el buffer de lisis nuclear y una vez con PBS. Los complejos formados con el anticuerpo fueron eluidos, y el *crosslinking* fue revertido mediante el agregado a cada muestra del buffer de digestión (Tris-HCl 50 mM, pH:8; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; SDS 0.5 %, Proteinase K 100  $\mu$ g/ml) y calentando durante 3 hs a 60°C y luego

durante 6 hs a 65°C. El DNA fue extraído utilizando una mezcla de fenol/cloroformo (49:1) y luego precipitado utilizando como carrier 20  $\mu$ g de glucógeno.

El DNA fue resuspendido en 20  $\mu$ l de agua libre de RNAsa y utilizado para análisis por PCR semicuantitativa (descrita más arriba). El producto de la reacción correspondió a un fragmento de 168 pb. Para cada muestra, las PCRs fueron realizadas con distintos números de ciclos o con diluciones seriadas del DNA utilizado como input para determinar el rango lineal de amplificación. Los resultados cuantificados caen dentro de este rango.

Los primers utilizados para esta PCR semicuantitativa fueron:

1-Los sitios de unión al DNA de T-bet dentro del promotor de IFN- $\gamma$

(forward): 5'-CAATTCAAACCTTCTCTGAG-3'

(reverse): 5'-CCGTTCTATGTTCTCTATTA-3'

2- $\beta$ -actina:

(forward): 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA -3'

(reverse): 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG -3'

Se realizaron controles sin anticuerpos y también con una inmunoglobulina IgG<sub>1</sub> no específica. La semicuantificación fue realizada en la fase exponencial de la amplificación por PCR. Además, se realizó el análisis densitométrico utilizando el programa NIH-Image, y luego los datos fueron normalizados al DNA input utilizado para cada inmunoprecipitación individual.

## III.8. MÉTODOS BIOQUÍMICOS

### III.8.1. Análisis de las transfecciones

#### III.8.1.1. Preparación de extractos celulares para detección de actividad Luciferasa- $\beta$ -Galactosidasa

Una vez terminado el tiempo de estimulación, el medio de cada pocillo conteniendo las células fue colocado en tubos eppendorf y centrifugado a 3000 rpm a 4°C, el medio fue descartado y las células lavadas con PBS y recentrifugadas a 3000 rpm a 4°C. Luego se agregaron 100  $\mu$ l de buffer de lisis (5 X passive lysis buffer, Promega, Madison, WI, EUA) a cada pellet de células, se las incubó 10 min a temperatura ambiente. El producto de la lisis fue centrifugado nuevamente a 10000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue almacenado a -80°C para la posterior determinación de las distintas actividades enzimáticas según corresponda.

#### III.8.1.2. Ensayo de actividad luciferasa

La medición de la actividad Luc se realizó utilizando un kit comercial (Promega, Madison, WI, EUA) y un luminómetro Junior Berthold. Se colocaron 20-30  $\mu$ l de los extractos celulares en tubos de ensayo de polipropileno y se les agregó 100  $\mu$ l de la mezcla del kit conteniendo luciferina y ATP y se midió inmediatamente la actividad por 30 seg. Como blanco se utilizó el buffer de lisis sin extractos celulares o con extractos de células no transfectadas con genes reporteros.

#### III.8.1.3. Ensayo de actividad $\beta$ -Galactosidasa

Se pipetearon 20  $\mu$ l de extractos celulares por pocillo en placas de 96 pocillos. Luego se les agregaron 100  $\mu$ l del buffer  $\beta$ -gal 1X por pocillo conteniendo: Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 M, pH:7,4); MgCl<sub>2</sub> (1 mM);  $\beta$ -mercaptoetanol (0,05 M); Orto-nitro-fenil-galactopiranosido (ONPG) (0,66 mg/ml), este último es el sustrato que reacciona con la  $\beta$ -galactosidasa dando un color amarillo. Las placas se incubaron 2-4 hs a 37°C hasta la obtención de un color amarillo moderado y la

reacción colorimétrica se detuvo con el agregado de 100  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 M) por pocillo. Luego se midió la absorbancia a 415 nm en espectrofotómetro (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

### **III.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La estadística fue analizada mediante análisis de la varianza (ANOVA) en combinación con el test de Scheffé's. Los datos son mostrados como el valor medio  $\pm$  error estándar.

## **IV. RESULTADOS**

---

La sección de resultados está dividida en dos partes A y B. La parte A muestra la regulación mediada por GC del FT Th1 específico T-bet y su interacción con citoquinas inmunomodulatorias Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-12. La parte B muestra la regulación por GC del FT Th2 específico GATA-3 y su interacción con citoquinas Th2 como IL-4 e IL-5.

---

## PARTE A

---

### IV.1. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN T HELPER 1, T-BET

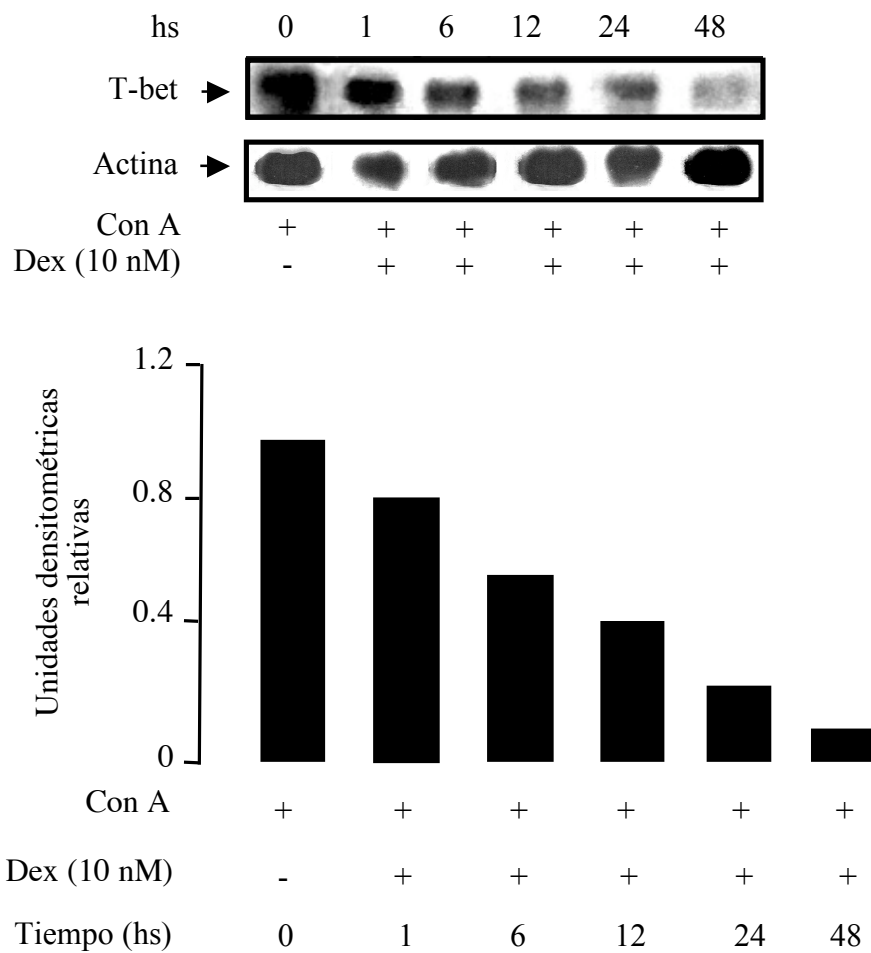
#### IV.1.1. Los Glucocorticoides inhiben la expresión del RNAm de T-bet y esta inhibición es revertida por la citoquina diferenciadora T helper 1 IL-12

Nuestro primer objetivo fue estudiar la regulación por GC del FT T-bet, que como previamente hemos discutido es clave para la diferenciación Th1 y su interacción con citoquinas inmunomodulatorias.

Para ello realizamos experimentos de Northern Blot en cultivos primarios de esplenocitos de ratón estimulados con Con A (Mitógeno T) (2.5  $\mu$ g/ml) y co-estimulados con los GC Dex (sintético) e HC (natural) en dosis altas (1000 nM) y bajas (0.01 nM) y a tiempos cortos (1 hs) y largos (48 hs) en presencia o ausencia de IL-12 (5 ng/ml) o IFN- $\gamma$  (5 ng/ml). Observamos que Dex es capaz de inhibir la expresión del RNAm de T-bet tanto a tiempos cortos como tiempos largos (Fig. 15).

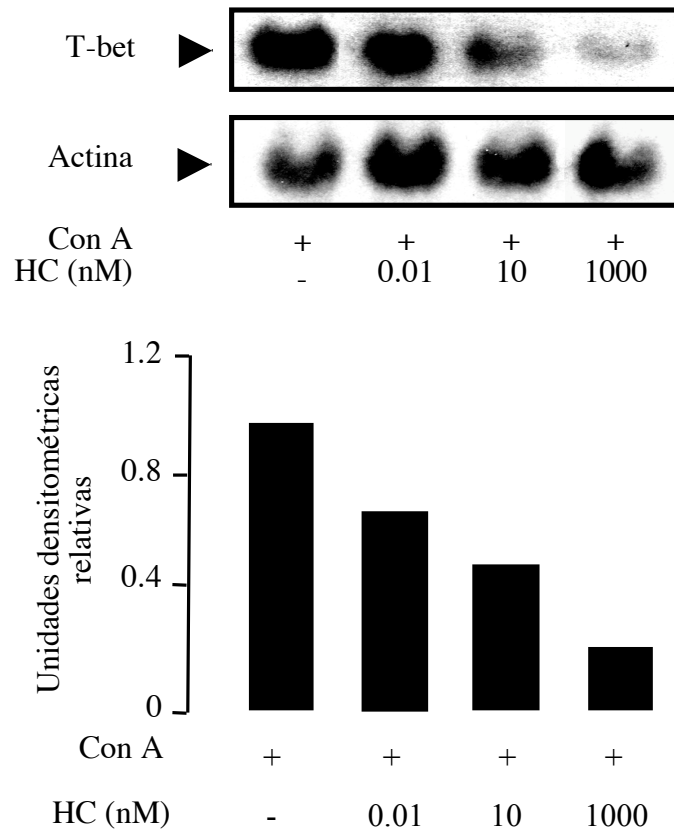
Decidimos trabajar a tiempos cortos para descartar que el efecto inhibitorio de GC que vemos a tiempos largos, se deba a la inhibición, reportada por otros autores, de la síntesis de citoquinas diferenciadoras Th1 como IL-12, las cuales a su vez son capaces de inducir la expresión de T-bet (Franchimont et al., 1998; Visser et al., 1998; Smits et al., 2001).

A su vez, trabajamos con ambos tipos de GC (Dex e HC) a dosis altas y bajas debido a que el efecto de los GC en la diferenciación dependería no solo del tiempo de aplicación sino también del tipo y dosis de GC usado (Bertoglio y Leroux, 1988; Daynes y Araneo, 1989; Brinkmann y Kristofic, 1995; Blotta et al., 1997; Dozmorov y Miller, 1998; Ramirez, 1998; Visser et al., 1998). Vemos que tanto Dex como HC a dosis altas y bajas y a tiempos cortos y largos, inhiben la expresión del RNAm de T-bet (Fig. 16).



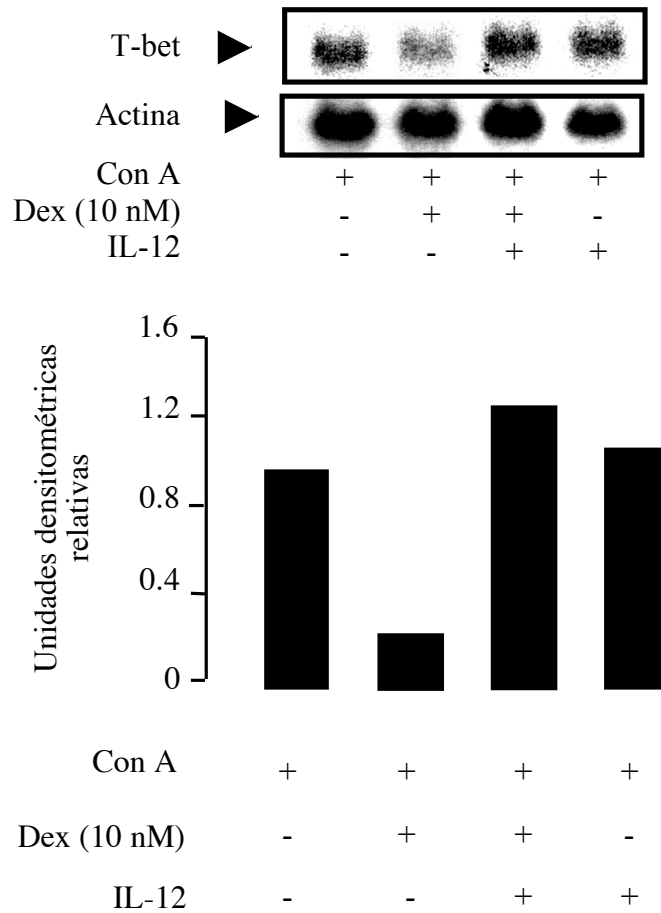
**Figura 15: Los GC inhiben la expresión del RNAm de T-bet a tiempos largos y cortos.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 48 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 10 nM) durante las últimas 1, 6, 12, 24 y 48 hs de incubación. Luego se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de T-bet por Northern Blot (20  $\mu$ g por calle). Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a T-bet. Se utilizó la señal de  $\beta$ -actina como control. La intensidad de la señal que corresponde a T-bet o a  $\beta$ -actina fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como intensidades relativas de T-bet respecto a los niveles de RNAm de  $\beta$ -actina. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.





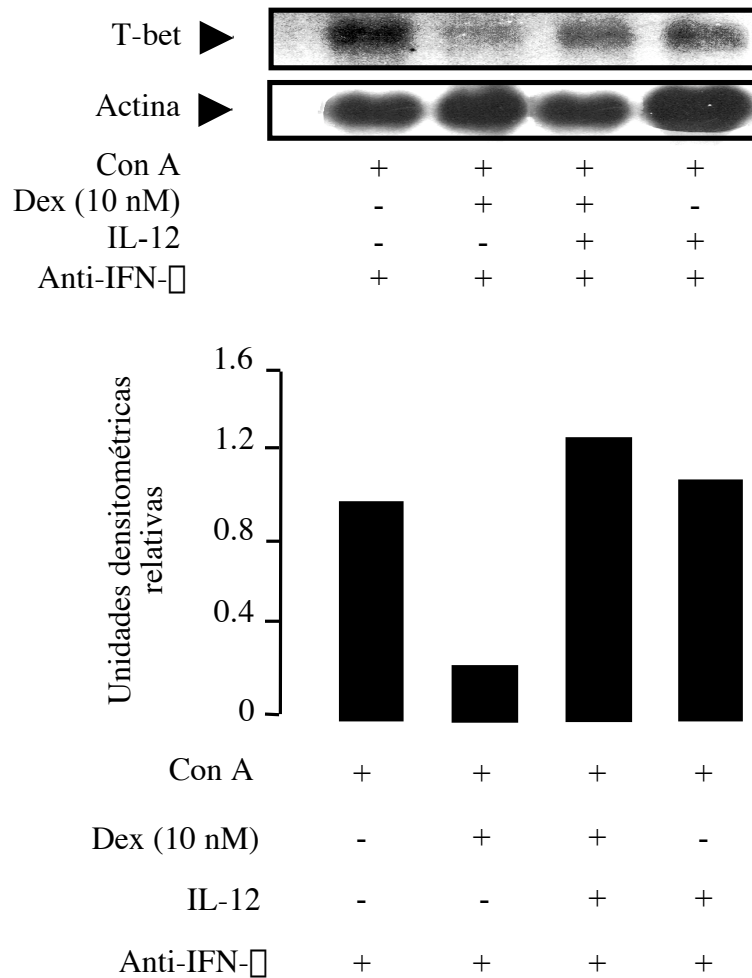
**Figura 16: GC inhiben la expresión del RNAm de T-bet tanto a dosis altas como bajas.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide hidrocortisona (HC, 0.01-1000 nM) durante 24 hs. Luego, se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de T-bet por Northern Blot (20  $\mu$ g por calle). Se vieron bandas únicas que corresponden a T-bet. Se utilizó la señal de  $\beta$ -actina como control. La intensidad de la señal que corresponde a T-bet o a  $\beta$ -actina fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como intensidades relativas de T-bet respecto a los niveles de RNAm de  $\beta$ -actina. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

Como IL-12 es una citoquina clave para la diferenciación Th1, capaz de inducir la expresión de T-bet, decidimos analizar el efecto de IL-12 sobre la inhibición mediada por GC de la expresión de T-bet. En la Figura 17 podemos observar que IL-12 revierte la inhibición mediada por GC de la expresión de T-bet.

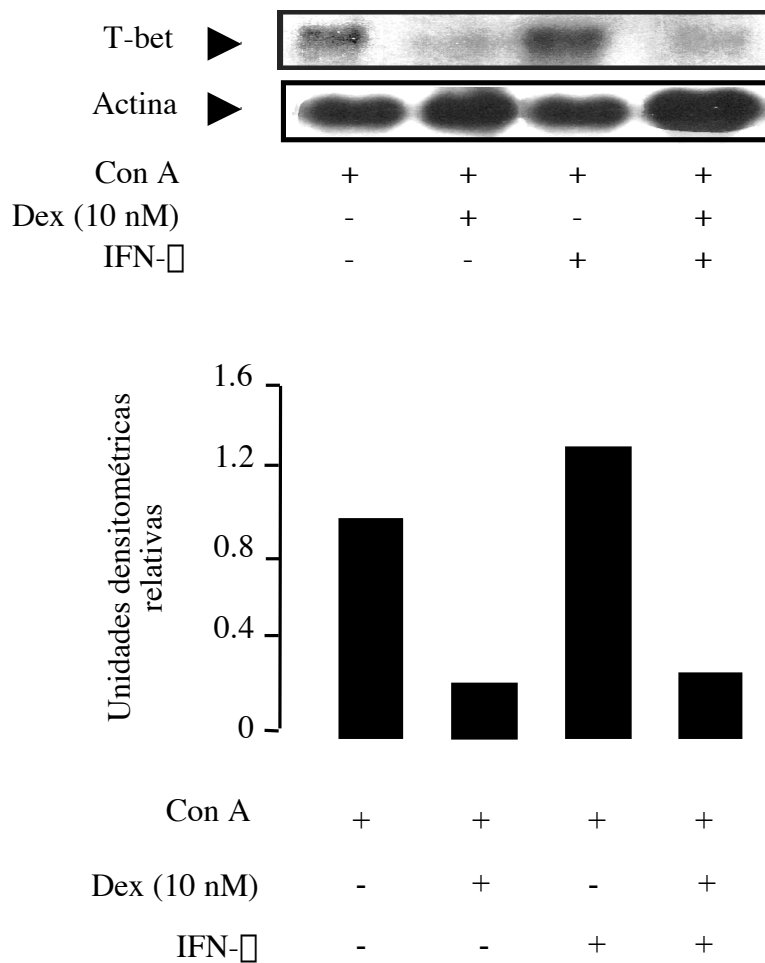


**Figura 17: La inhibición mediada por GC de la expresión del RNAm de T-bet es revertida por IL-12.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 10 nM) durante 24 hs e IL-12 (5 ng/ml). Luego se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de T-bet por Northern Blot (20  $\mu$ g por calle). Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a T-bet. Se utilizó  $\beta$ -actina como control. La intensidad de la señal que corresponde a T-bet o a  $\beta$ -actina fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como intensidades relativas de T-bet respecto a los niveles de RNAm de  $\beta$ -actina. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

Para poder determinar si el efecto de IL-12 sobre la expresión de T-bet se debe a un efecto directo o se debe a que es capaz de inducir la síntesis de IFN- $\gamma$  y este a su vez inducir T-bet, llevamos a cabo los ensayos de Northern Blot en presencia de anticuerpos bloqueantes anti-IFN- $\gamma$ . Vemos que aún en ausencia de IFN- $\gamma$  IL-12 es capaz de revertir el efecto inhibitorio de los GC (Fig. 18). De hecho, a pesar que IFN- $\gamma$  es una citoquina Th1 también involucrada en la inducción de T-bet, investigamos el efecto de IFN- $\gamma$  sobre la inhibición mediada por GC de la expresión de T-bet y vemos que IFN- $\gamma$  a pesar de inducir la expresión de T-bet, no es capaz de revertir la inhibición mediada por GC cuando IL-12 se encuentra neutralizada (Fig. 19).



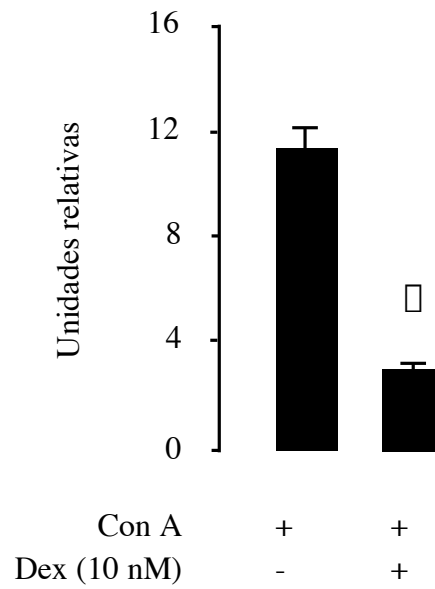
**Figura 18: La inhibición mediada por GC de la expresión del RNAm de T-bet es revertida por IL-12 en ausencia de IFN- $\gamma$ .** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 10 nM) durante 24 hs, IL-12 (5 ng/ml) y anti-IFN- $\gamma$  (10  $\mu$ g/ml). Luego se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de T-bet por Northern Blot (20  $\mu$ g por calle). Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a T-bet. Se utilizó la señal de  $\beta$ -actina como control. La intensidad de la señal que corresponde a T-bet o a  $\beta$ -actina fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como intensidades relativas de T-bet respecto a los niveles de RNAm de  $\beta$ -actina. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.



**Figura 19: IFN- $\gamma$  no es capaz de revertir la inhibición mediada por GC de la expresión del RNAm de T-bet.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 10 nM) durante 24 hs, IFN- $\gamma$  (5 ng/ml) y anticuerpo neutralizante anti-IL12 (10  $\mu$ g/ml). Luego se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de T-bet por Northern Blot (20  $\mu$ g por calle). Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a T-bet. Se utiliza la señal de  $\beta$ -actina como control. La intensidad de la señal que corresponde a T-bet o a  $\beta$ -actina fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como intensidades relativas de T-bet respecto a los niveles de RNAm de  $\beta$ -actina. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

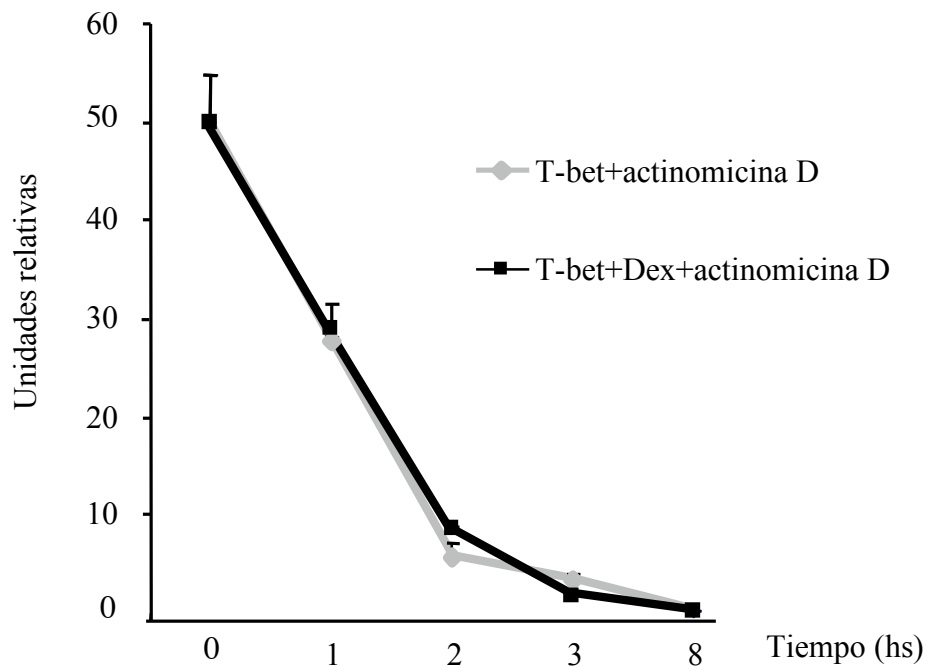
Concluimos que IL-12 es capaz de revertir por sí sola el efecto inhibitorio de los GC sobre la expresión de T-bet. Este efecto de IL-12 no está mediado por IFN- $\gamma$  que a pesar de ser una citoquina Th1 que induce la expresión de T-bet, no es capaz de revertir la inhibición mediada por GC.

A continuación, confirmamos de manera cuantitativa por la técnica de PCR en tiempo real la inhibición por GC de la expresión del RNAm de T-bet en relación a la expresión de  $\beta$ -actina y confirmamos los datos obtenidos por Northern Blot (Fig. 20). Obtuvimos resultados similares a 2, 6, 12, y 48 hs (datos no mostrados).



**Figura 20. Los GC inhiben la expresión del RNAm de T-bet: Análisis por PCR en tiempo real.** Se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de T-bet por PCR en tiempo real en exactamente las mismas condiciones que se utilizaron para el Northern Blot (Fig. 15) utilizando Platinum SYBR Green 1 en 50  $\mu$ l de volumen final de reacción por cuadruplicado para cada DNAc. Las muestras fueron cuantificadas usando curvas standard relativas para cada reacción de amplificación y los resultados fueron normalizados al control interno de  $\beta$ -actina. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 3, B:  $\square$  p<0.001 vs. Con A, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

Para poder determinar si la inhibición de la expresión del RNAm de T-bet mediada por GC se debe a un efecto directo de los GC sobre la transcripción de T-bet o se debe a que los GC inducen la degradación del mensajero, decidimos llevar a cabo los experimentos de expresión del RNAm en presencia del inhibidor de la transcripción, actinomicina D. En la Figura 21 vemos que la inhibición no se debe a una disminución de la estabilidad del RNAm si no más bien a un efecto sobre la transcripción ya que no se observan diferencias debido a la acción de Dex sobre la inhibición con actinomicina D.

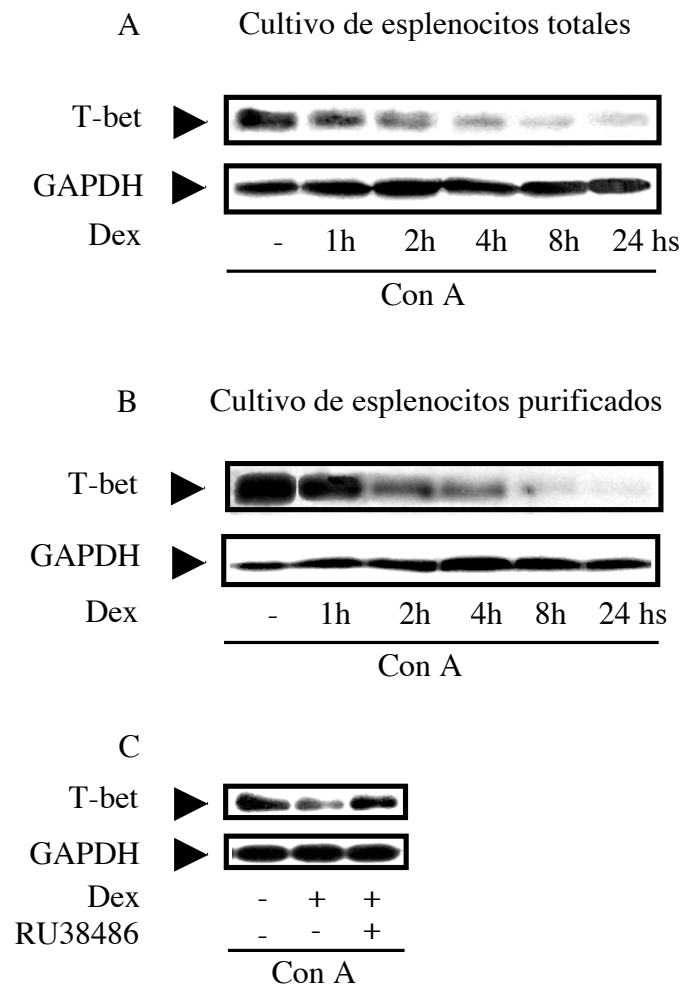


**Figura 21. Los GC no inducen la degradación de T-bet.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 10 nM) durante 1, 2, 3 y 8 hs, precedido por 15 minutos de tratamiento con actinomicina D (5  $\mu$ g/ml). Luego se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de T-bet por PCR en tiempo real en exactamente las mismas condiciones que se utilizaron para el Northern Blot utilizando Platinum SYBR Green 1 en 50  $\mu$ l de volumen final de reacción por cuadruplicado para cada DNAc. Las muestras fueron cuantificadas usando curvas standard relativas para cada reacción de amplificación, y los resultados fueron normalizados al control interno de  $\beta$ -actina. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.1.2. Los Glucocorticoides inhiben la síntesis proteica de T-bet

Para poder determinar si la inhibición mediada por GC de la expresión del RNAm de T-bet es acompañada de una disminución de sus niveles proteicos, realizamos ensayos de Western Blot en cultivos primarios de esplenocitos totales de ratón y purificados (enriquecidos en linfocitos T) (Fig. 22 A y B), estimulados con Con A por 24 hs en presencia de Dex (100 nM) durante las últimas 1, 2, 4, 8 y 24 hs de incubación.

Observamos en ambos cultivos la inhibición de la síntesis proteica de T-bet en presencia de GC. El antagonista específico del GR, RU38486, revirtió la inhibición, probando la especificidad de la acción del GR (Fig. 22 C).

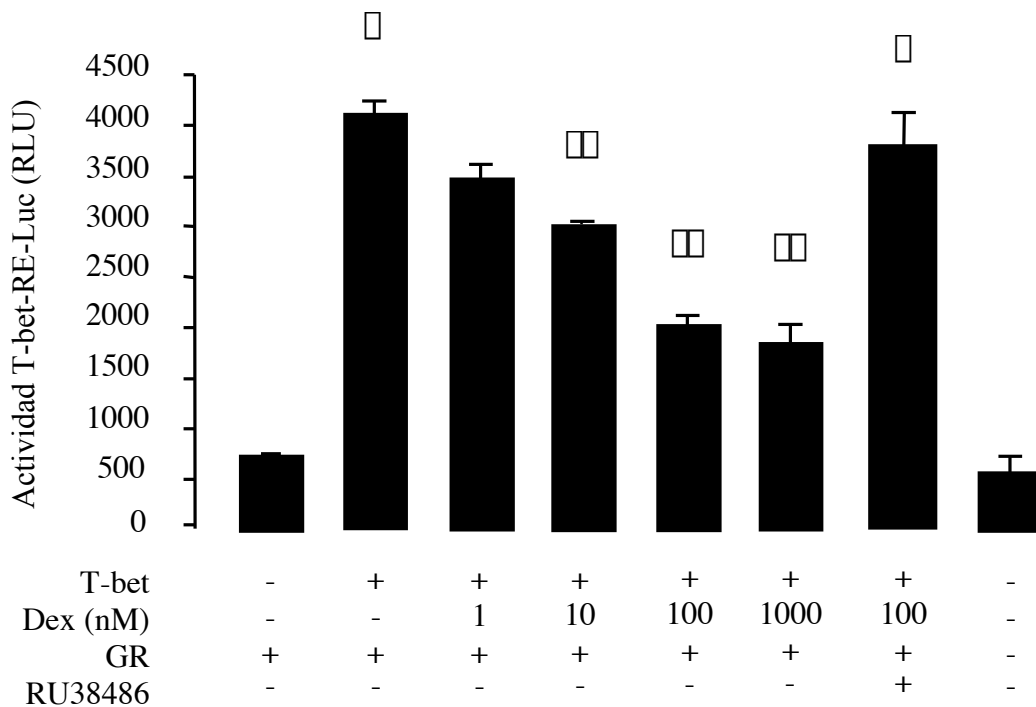


**Figura 22. Los GC inhiben los niveles proteicos de T-bet.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón totales y purificados fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 100 nM) durante las últimas 1, 2, 4, 8 y 24 hs de incubación. Se agregó al cultivo el antagonista específico del receptor de glucocorticoides (GR) RU38486 (1  $\mu$ M), 30 minutos antes del tratamiento de las células por 2 hs con Dex. Luego se preparó el lisado de las células para el análisis por Western Blot. Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a T-bet (65 kDa). Se utilizó la señal de GAPDH como control de carga. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.1.3. Los Glucocorticoides inhiben la actividad transcripcional de T-bet

A continuación, analizamos si los GC también regulan la actividad transcripcional de T-bet. Para ello, diseñamos una construcción reportera utilizando secuencias oligonucleotídicas que contienen los elementos de respuesta de T-bet descritos en el promotor de IFN- $\gamma$  y los clonamos río arriba del gen de la luciferasa. De esta manera obtuvimos una construcción reportera que contiene los elementos de respuesta a T-bet (T-bet-RE-Luc). Esta construcción

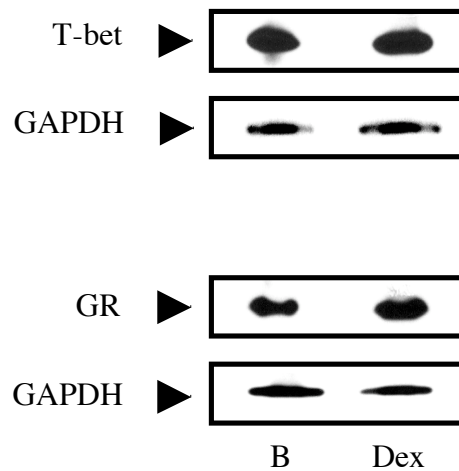
nos sirve para investigar el rol de los GC sobre la actividad transcripcional de T-bet. La transfección de la línea celular EL-4, modelo de linfocito Th0 (Lee et al., 1995; Siegel et al., 1995; Ouyang et al., 1998; Lee et al., 2000; Szabo et al., 2000; Hwang et al., 2002; Klein-Hessling et al., 2003), con T-bet-RE-Luc y el vector de expresión de T-bet (pcDNA3-T-bet) mostró un aumento de casi cinco veces en la actividad del reportero de T-bet (Fig. 23). La cotransfección del vector de expresión de GR (CMV-hGR) en presencia de Dex, produjo una potente inhibición dosis dependiente de la actividad transcripcional de T-bet ( $53 \pm 3\%$  de inhibición con respecto a Dex 100 nM). La reversión de la inhibición utilizando el antagonista específico de GR, el RU38486 muestra que el GR esta directamente involucrado en la inhibición mediada por GC de la actividad transcripcional de T-bet. Bajo condiciones de activación utilizando ionomicina y PMA no se observaron diferencias importantes y se obtuvieron resultados similares en la línea celular Jurkat (datos no mostrados).



**Figura 23. Los GC inhiben la actividad transcripcional de T-bet.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g de un plásmido reportero el cual contine los elementos de respuesta de T-bet río arriba del gen de la luciferasa (T-bet-RE-Luc) en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR). Luego de 2 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 20 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 1, 10, 100 y 1000 nM) y con el antagonista del GR RU38486 (1  $\mu$ M). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p<0.001 vs. basal sin Dex,  $\square$  p<0.001 vs. T-bet sin Dex, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos con resultados similares.

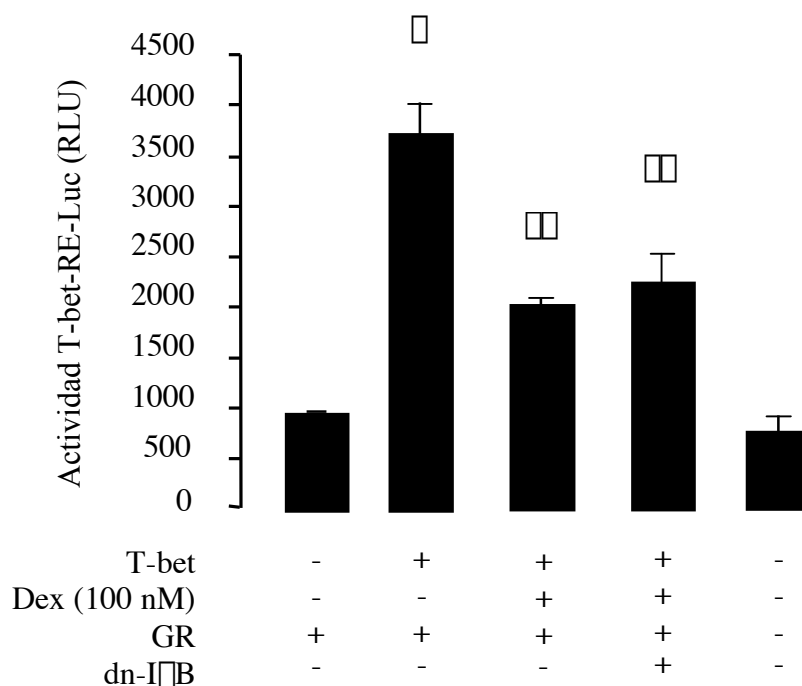


Como la inhibición de la actividad de T-bet podría ser el resultado de una disminución de la expresión proteica de T-bet mediada por la acción de GC sobre el promotor pcDNA3 que rige la expresión del vector de T-bet, analizamos los niveles proteicos de T-bet por Western Blot bajo las mismas condiciones experimentales y observamos que los GC no afectan los niveles de expresión de T-bet (Fig. 24). Como no se observa una inhibición de los niveles proteicos de T-bet, concluimos que el efecto de los GC es directamente sobre la actividad transcripcional de T-bet. Además observamos que los GC tampoco afectan los niveles de expresión del GR (Fig. 24)



**Figura 24. Regulación por GC de la expresión proteica del plásmido pcDNA3-T-bet.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR). Luego de 2 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 20 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM). Se preparó el lisado de las células para el análisis por Western Blot. Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a T-bet y a GR (65 kDa para T-bet y 94 kDa para GR). Se utilizó la señal de GAPDH como control de carga. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

Para descartar la posibilidad de que la inhibición de la actividad transcripcional de T-bet este mediada por competición entre el GR y T-bet por el FT NF- $\kappa$ B (Hwang et al., 2005a), repetimos los mismos ensayos de transfección utilizados para evaluar la actividad transcripcional de T-bet pero en presencia de un vector de expresión que codifica para la proteína dominante negativa de I kappa B (dn-I $\kappa$ B) (Traenckner et al., 1995) (Fig. 25). Confirmamos que los GC inhiben la actividad transcripcional de T-bet sin que exista interferencia de NF- $\kappa$ B.

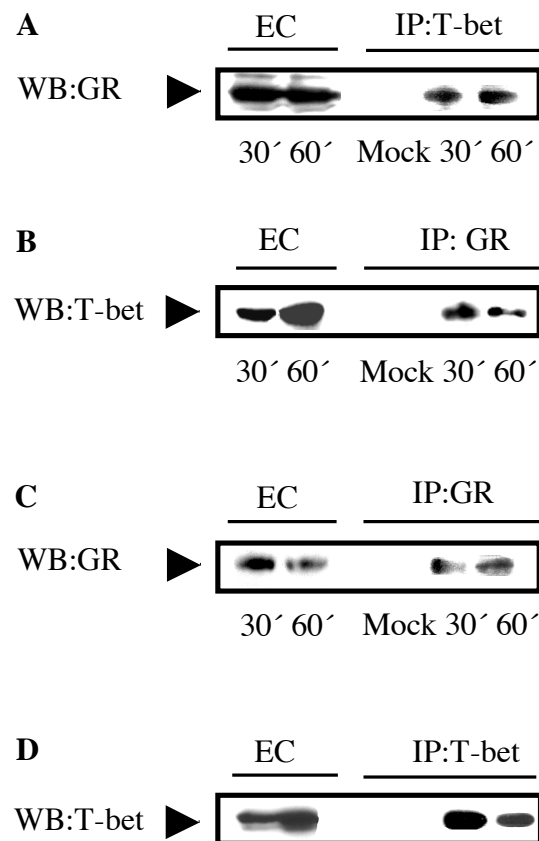


**Figura 25. Los GC inhiben la actividad transcripcional de T-bet sin interferencia de NF- $\kappa$ B.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 8  $\mu$ g de un plásmido reportero el cual contiene los elementos de respuesta de T-bet río arriba del gen de la luciferasa (T-bet-RE-Luc) en presencia (+) o ausencia (-) de 8  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet), 8  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) y 8  $\mu$ g del vector de expresión que codifica para la proteína dominante negativa de I $\kappa$ B (dn-I $\kappa$ B). Luego de 2 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 20 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p<0.001 vs. basal sin Dex,  $\square$  p<0.001 vs. T-bet sin Dex, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos con resultados similares.

#### IV.1. 3.1. Asociación física entre el receptor de glucocorticoides y T-bet exógenos

Como se detalló en la introducción, la inhibición de la actividad transcripcional de un FT por GC puede ocurrir a distintos niveles y por distintos mecanismos. Es sabido que uno de los principales mecanismos implicados en la inhibición de genes que participan de la respuesta inmune por GC es el de transrepresión que involucra la interacción proteína-proteína entre el GR y el FT que regula al gen en cuestión. Por tal motivo y con el fin de poder dilucidar el mecanismo molecular intrínseco involucrado en la inhibición de la actividad de T-bet, realizamos experimentos de coimmunoprecipitación en las células EL-4 cotransfectadas con el vector de expresión del GR y de T-bet. Como se observa en la Figura 26, el GR

coimmunoprecipita con T-bet ya sea cuando se utiliza para inmunoprecipitar el anticuerpo anti-GR o el anti-T-bet (Fig. 26 A y B). Se realizaron controles usando los mismos anticuerpos inmunoprecipitantes para mostrar que la inmunoprecipitación y el Western Blot de T-bet y GR fueron llevados a cabo correctamente (Fig. 26 C y D). También se incluye el análisis de los extractos crudos que fueron utilizados como controles para demostrar la presencia de T-bet y GR en el ensayo. Estos resultados muestran la interacción proteína-proteína entre GR y T-bet.



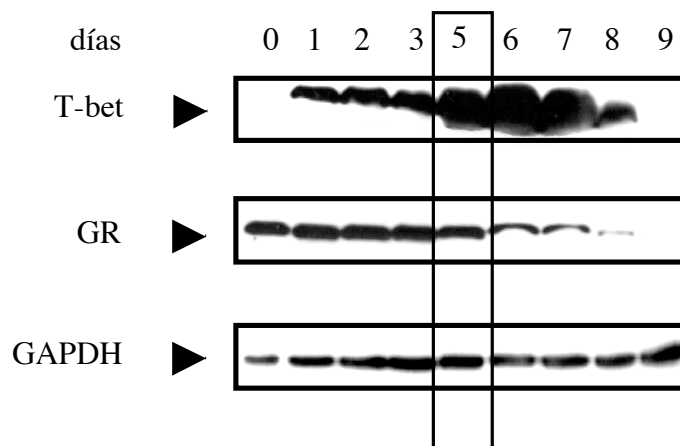
**Figura 26. El GR y T-bet exógenos coimmunoprecipitan.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 20  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) y 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet) (A-D). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron tratadas durante 30 o 60 minutos con dexametasona (Dex, 100 nM) bajo condiciones activantes utilizando ionomicina 1  $\mu$ M y PMA 0.1  $\mu$ M. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con Proteína A-G Sepharosa en combinación con los siguientes anticuerpos (1  $\mu$ g/ml): A y D anti-T-bet; B y C: anti-GR. Las fracciones inmunoprecipitadas y los extractos crudos (EC) fueron analizados por Western Blot (WB) (65 kDa para T-bet y 94 kDa para GR), como está descripto en Materiales y Métodos, usando los siguientes anticuerpos (100 ng/ml): A y C: anti-GR; B y D: anti-T-bet; y luego incubados con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (dilución: 1:3000). Se incluyeron controles Mock realizados en las mismas condiciones pero en ausencia de extractos celulares. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.1.3.2. Asociación física entre el receptor de glucocorticoides y T-bet endógenos

Tomando en cuenta que la sobreexpresión por transfección exógena de proteínas puede conducir a asociaciones artificiales por ejemplo por un incorrecto plegamiento proteico, analizamos la asociación física entre la proteína de GR y T-bet expresados de manera endógena.

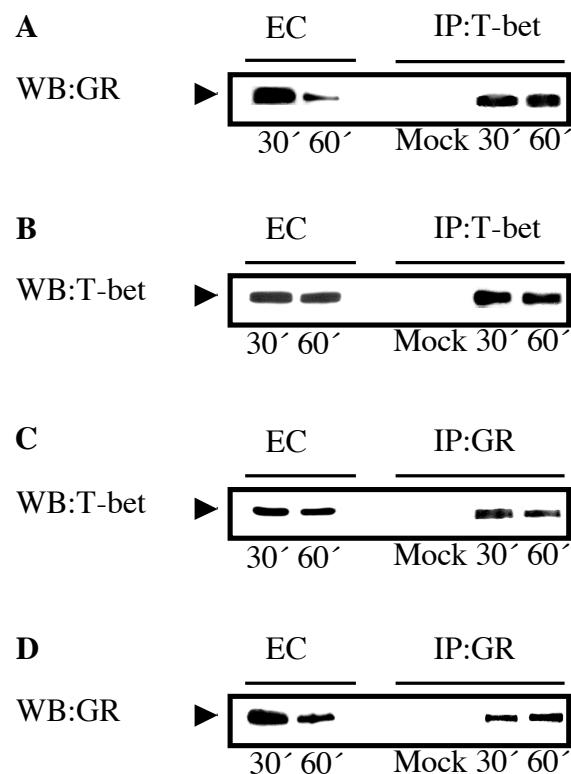
Para ello primero definimos las condiciones óptimas para la inducción de T-bet y GR. Esplenocitos purificados de ratón activados con Con A son estimulados bajo condiciones diferenciadoras Th1 utilizando IL-12 (5 ng/ml) e IL-10 (10 ng/ml) y el anticuerpo neutralizante anti-IL-4 (10  $\mu$ g/ml). Las células fueron cosechadas todos los días durante un período de nueve días y los extractos proteicos analizados por Western Blot para ver la expresión endógena de GR y T-bet.

En la Figura 27 vemos que las condiciones óptimas para la expresión T-bet/GR se dan al día cinco post-estimulación, por lo tanto el ensayo de coimmunoprecipitación de GR y T-bet endógenos se llevó a cabo en ese tiempo.



**Figura 27. Expresión temporal del GR y T-bet endógenos.** Células T purificadas fueron activadas con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs y luego bajo condiciones diferenciadoras Th1 usando IL-12 (5 ng/ml) e IL-10 (10 ng/ml) y anticuerpo neutralizante anti-IL-4 (10  $\mu$ g/ml) durante nueve días. También se agregó IL-2 (10 U/ml), para inducir la expansión clonal de las células T enriquecidas en T-bet. Las células fueron cosechadas los días 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, y 9 post-estimulación. Se prepararon los lisados celulares para analizar la expresión de T-bet y GR por Western Blot. Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a T-bet y GR (65 kDa para T-bet y 94 kDa para GR). Como control de carga se usó la señal de GAPDH. Se muestra uno de tres experimentos con resultados similares.

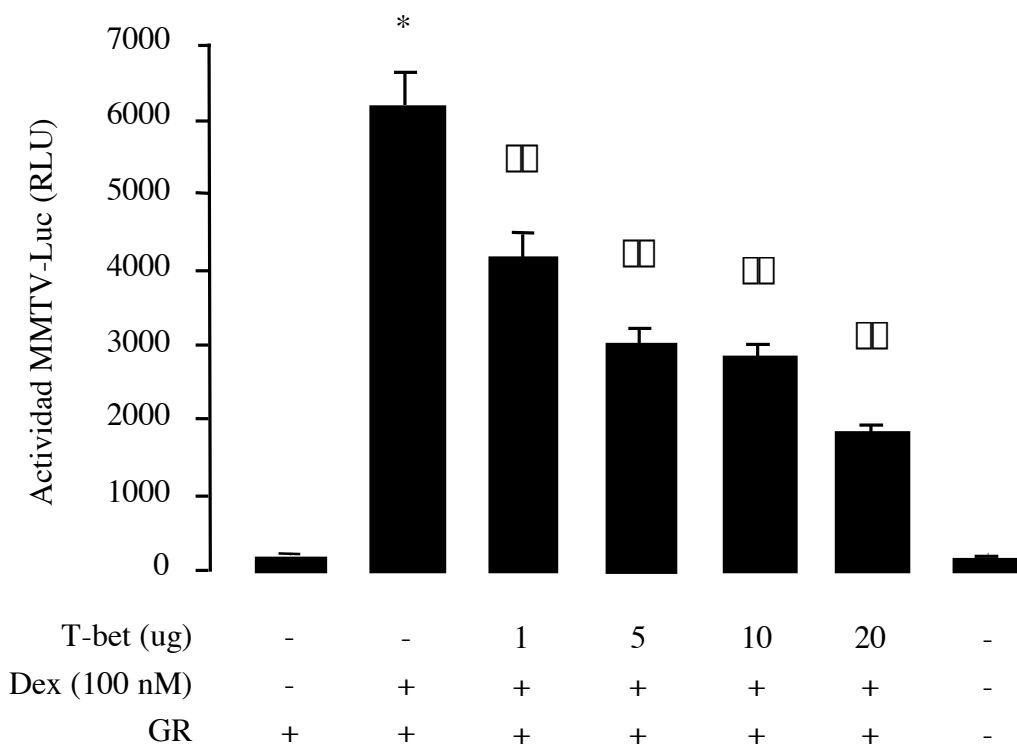
En estas condiciones de expresión endógena, como vemos en la Figura 28 A y C, el GR coinmunoprecipita con T-bet ya sea cuando se usó en los experimentos de coinmunoprecipitación el anticuerpo anti-T-bet o el anti-GR. Se realizaron controles usando los mismos anticuerpos inmunoprecipitantes para mostrar que la inmunoprecipitación y el Western Blot de T-bet y GR fueron llevados a cabo correctamente (Fig. 28 B y D). Para confirmar la presencia de T-bet y GR endógenos se analizaron los extractos crudos totales. Estos resultados confirman la interacción entre T-bet y GR endógenos en cultivos de linfocitos T activados.



**Figura 28. El GR y T-bet endógenos coinmunoprecipitan.** Los cultivos celulares enriquecidos en la expresión de T-bet fueron lavados dos veces con PBS y se les agregó medio fresco. Luego las células fueron tratadas durante 30 o 60 minutos con dexametasona (Dex, 100 nM) bajo condiciones activantes usando ionomicina 1  $\mu$ M y PMA 0.1  $\mu$ M. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con Proteína A-G Sepharosa en combinación con los siguientes anticuerpos (1  $\mu$ g/ml): A y B: anti-T-bet; C y D: anti-receptor de glucocorticoides (GR). Las fracciones inmunoprecipitadas y los extractos crudos (EC) fueron analizados por Western Blot (WB), como se describe en Materiales y Métodos, usando los siguientes anticuerpos (100 ng/ml): A y D: anti-GR; B y C: anti-T-bet; e incubados con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (dilución: 1:3000). Se incluyeron controles Mock realizados en las mismas condiciones pero en ausencia de extractos celulares. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

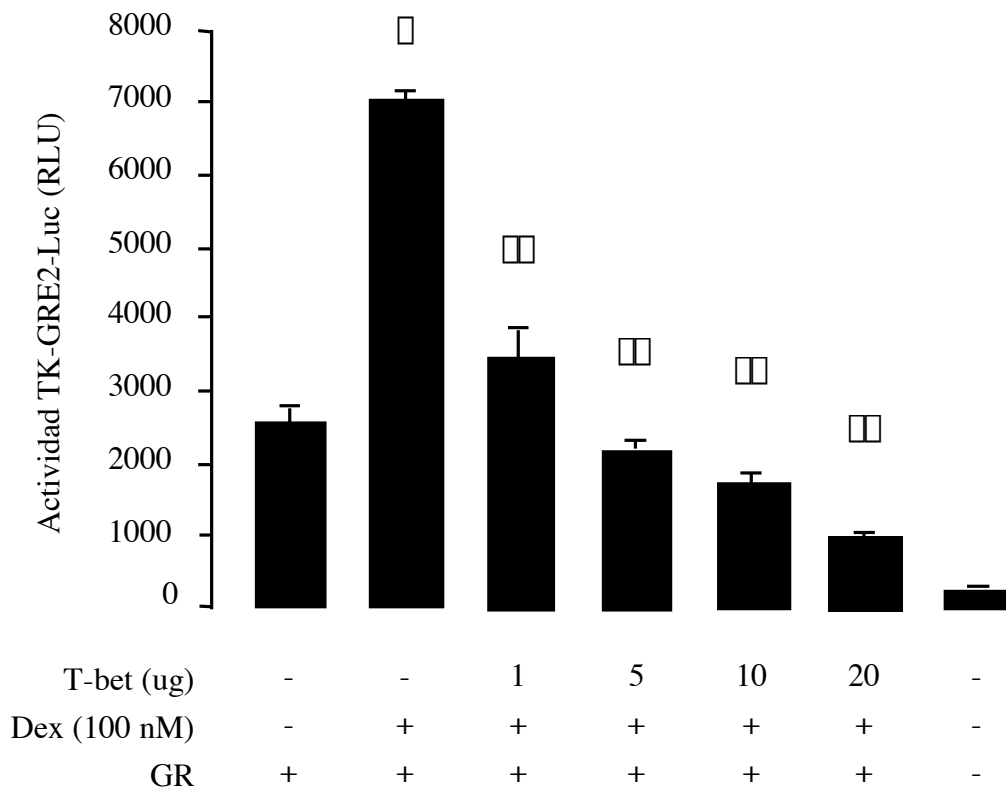
#### IV.1.3.3 Inhibición transcripcional mutua entre Glucocorticoides y T-bet

Teniendo en cuenta que GR y T-bet coimmunoprecipitan, es decir interaccionan y que los GC inhiben la actividad transcripcional de T-bet, nos preguntamos si T-bet a su vez es capaz de inhibir la actividad transcripcional de los GC. La transfección de la línea EL-4 con el vector de expresión del GR en presencia de Dex 100 nM, resulta en una importante activación del reportero de la actividad del GR, el MMTV-Luc. La cotransfección de distintas cantidades de T-bet junto con GR en presencia de Dex 100 nM lleva a la inhibición de la actividad transcripcional del GR de manera dosis dependiente (Fig. 29).



**Figura 29. T-bet inhibe la actividad transcripcional de los GC.** La línea celular EL-4 fue cotransfectada con 9  $\mu$ g del promotor tumoral mamario murino clonado río arriba del plásmido reportero del gen de la luciferasa (MMTV-Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) en presencia (+) o ausencia (-) de 1, 5, 10 y 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet). Luego de 16 hs en el medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p<0.001 vs. basal sin Dex,  $\square$  p<0.05 vs. Dex sin T-bet, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

Dado que MMTV-Luc contiene múltiples sitios regulatorios, quisimos comparar la acción inhibitoria descrita más arriba utilizando la construcción TK-GRE2-Luc que contiene solamente dos sitios palindrómicos para la unión del GR acoplados al promotor TK, junto con los vectores de expresión del GR y T-bet. La cotransfección de cantidades crecientes de T-bet junto con cantidades constantes de GR en presencia de Dex resulta en la inhibición de la actividad transcripcional de GR de manera dosis dependiente (Fig. 30), confirmando la inhibición de la actividad transcripcional del GR por T-bet. Estos experimentos muestran que T-bet y GR aparte de interactuar físicamente, también reprimen mutuamente su actividad transcripcional.

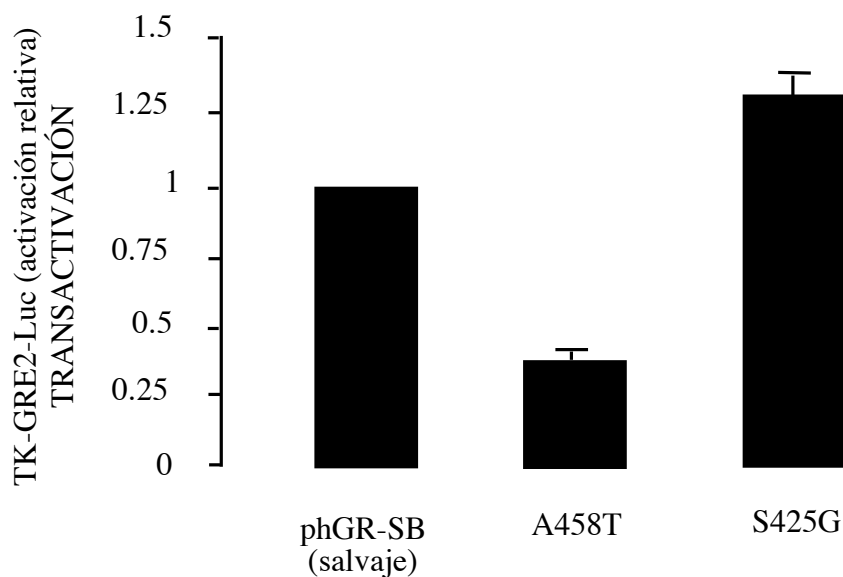


**Figura 30. T-bet inhibe la actividad transcripcional de los GC.** La línea celular EL-4 fue cotransfectada con 9  $\mu$ g de un plásmido reportero que contiene dos sitios palindrómicos de unión para el GR acoplados al plásmido reportero TK (TK-GRE2-Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) en presencia (+) o ausencia (-) de 1, 5, 10 y 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p<0.001 vs. basal sin Dex,  $\square$  p<0.05 vs. Dex sin T-bet, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.1.3.4. La inhibición por GC de la actividad transcripcional de T-bet se lleva a cabo por un mecanismo de transrepresión

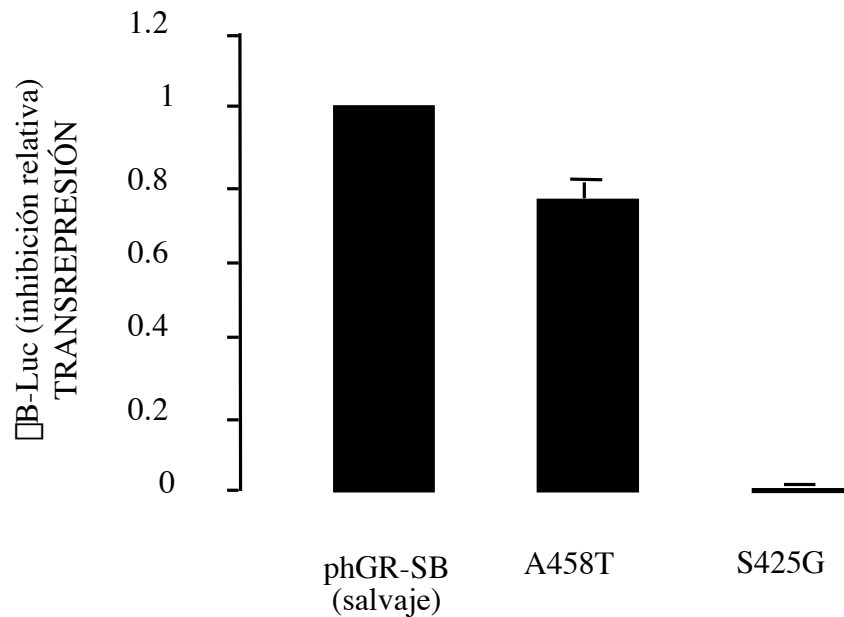
La inhibición transcripcional mutua entre GC y T-bet junto con el hecho de que GR y T-bet interaccionan físicamente nos llevó a pensar que el mecanismo molecular intrínseco implicado en dicha inhibición sería el de transrepresión el cual involucra la interacción proteína-proteína. Para confirmar que este es el mecanismo involucrado en dicha inhibición utilizamos las dos mutantes del GR descritas en Materiales y Métodos: S425G y A458T (Fig. 14).

Como fue previamente descrito (Heck et al., 1994; Tao et al., 2001), los experimentos control en las líneas EL-4 muestran que la mutante de transrepresión S425G es capaz de transactivar a TK-GRE2-Luc pero la mutante de transactivación A458T no es capaz de transactivar dicho reportero al ser comparadas con la actividad del GR salvaje (Fig. 31). Al contrario, la mutante de transactivación A458T es capaz de transreprimir la actividad de  $\beta$ -Luc y la mutante de transrepresión S425G no lo es, al ser comparadas con el GR salvaje (Fig. 32).



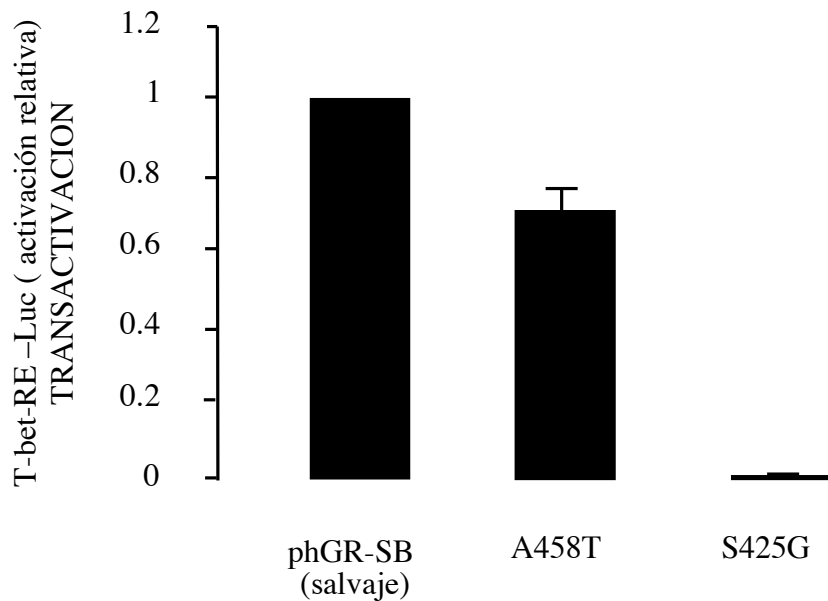
**Figura 31. Control de la capacidad de transactivar de las mutantes del GR.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g de un plásmido reportero que contiene dos sitios palindrómicos del receptor de glucocorticoides (GR) acoplados al plásmido reportero TK (TK-GRE2-Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del GR salvaje, phGR-SB (wt) o con las mutantes del GR A458T o S425G. Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 10 nM). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como relativos a la activación de TK-GRE2-Luc (relativos a la condición basal, phGR-SB (wt) =1) y como la media  $\pm$  SEM. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.





**Figura 32. Control de la capacidad de transreprimir de las mutantes del GR.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g de el plásmido reportero  $\beta$ -Luc clonado río arriba del gen de la luciferasa y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides (GR) salvaje, phGR-SB (wt) o con las mutantes del GR A458T o S425G. Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml), la cual induce vía NF- $\kappa$ B la actividad de  $\beta$ -Luc, en presencia o ausencia de dexametasona (Dex, 100 nM). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como relativos a la inhibición de  $\beta$ -Luc (relativos a la condición basal, phGR-SB (wt) =1) y como la media  $\pm$  SEM. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

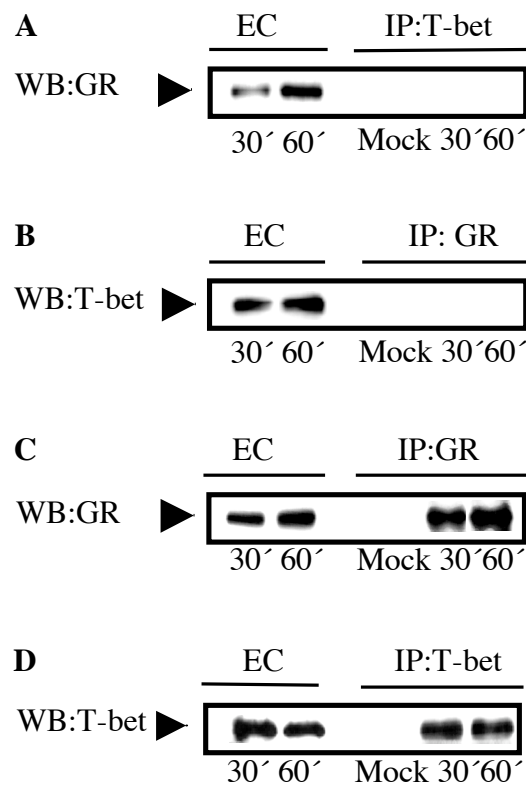
La habilidad de estas mutantes del GR de inhibir la actividad del reportero T-bet-RE-Luc se muestra en la Figura 33. Vemos que la mutación A458T no tiene ningún efecto sobre la capacidad del GR de inhibir la actividad transcripcional de T-bet, mientras que la mutación S425G bloquea la capacidad de GR de inhibir la actividad de T-bet, confirmando, junto a los datos previos, que el mecanismo implicado en dicha inhibición es el de transrepresión.



**Figura 33. Los GC iniben la actividad transcripcional de T-bet por el mecanismo de transrepresión.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g de un plásmido reportero que contiene los elementos de respuesta de T-bet clonados río arriba del gen de la luciferasa (T-bet-RE-Luc) en presencia o ausencia de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides salvaje (ph-GR-SB) o con las mutantes del receptor de glucocorticoides with A458T o S425G. Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con con o sin dexametasona (Dex, 100 nM). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como relativos a la inhibición de T-bet-RE-Luc (relativos a la condición basal, phGR-SB (wt) =1) y como la media  $\pm$  SEM. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.1.3.5. La mutación S425G en el receptor de glucocorticoides afecta su capacidad de interactuar físicamente con T-bet

Con el objetivo de analizar si la mutación S425G también afecta la capacidad del GR de interactuar con T-bet, realizamos los ensayos de coimmunoprecipitación transfectando la mutante del GR S425G y T-bet bajo las mismas condiciones utilizadas para los ensayos anteriores. Las Figura 34 A y B muestran que la mutante S425G no coimmunoprecipita con T-bet ya sea cuando se utiliza el anticuerpo anti-T-bet o el anti-GR. Se incluyeron los controles que utilizan los mismos anticuerpos para la inmunoprecipitación y para el Western Blot tanto para la mutante de GR como para T-bet (Fig. 34 C y D). También se incluyen los controles con extractos crudos. Estos hallazgos corroboran que la transrepresión mutua entre GR y T-bet involucran la interacción proteína-proteína y que la interacción y transrepresión son inhibidas con la mutación S425G.

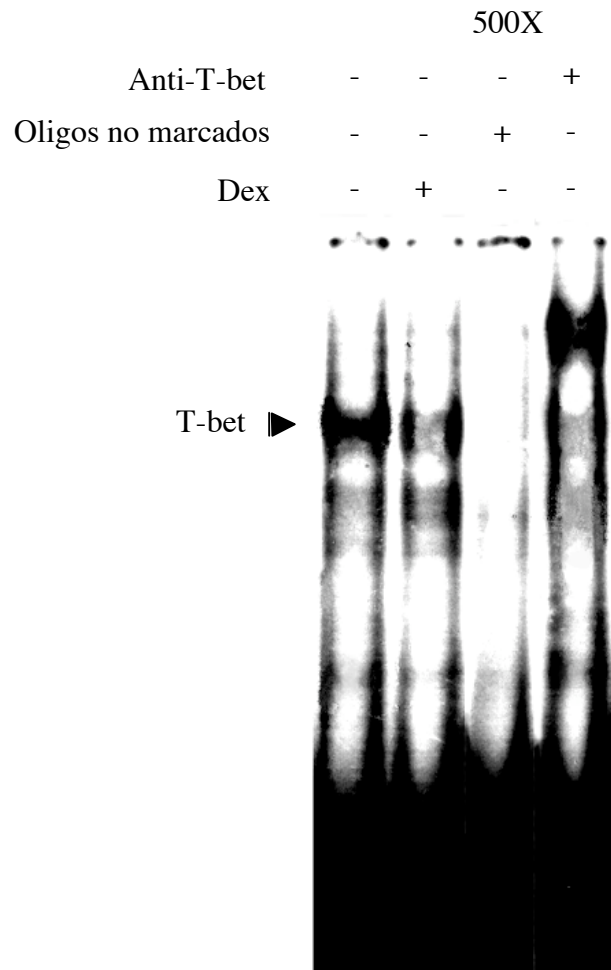


**Figura 34. T-bet no coimmunoprecipita con la mutante del GR S425G.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 20  $\mu$ g de la mutante del vector de expresión del receptor de glucocorticoides (GR) S425G y 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet) (A-D). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron tratadas durante 30 o 60 minutos con dexametasona (Dex, 100 nM) bajo condiciones activantes utilizando ionomicina 1  $\mu$ M y PMA 0.1  $\mu$ M. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con Proteína A-G Sepharosa en combinación con los siguientes anticuerpos (1  $\mu$ g/ml): A y D: anti-T-bet; B y C: anti-GR. Las fracciones inmunoprecipitadas y los extractos crudos (EC) fueron analizados por Western Blot (WB) (65 kDa para T-bet y 94 kDa para GR), como está descrito en Materiales y Métodos, usando los siguientes anticuerpos (100 ng/ml): A y C: anti-GR; B y D: anti-T-bet; y luego incubados con anticuerpos secundarios conjudos con HRP (dilución: 1:3000). Se incluyeron controles Mock realizados en las mismas condiciones pero en ausencia de extractos celulares. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.1.4. Los Glucocorticoides inhiben la unión de T-bet a sus elementos de respuesta en el DNA

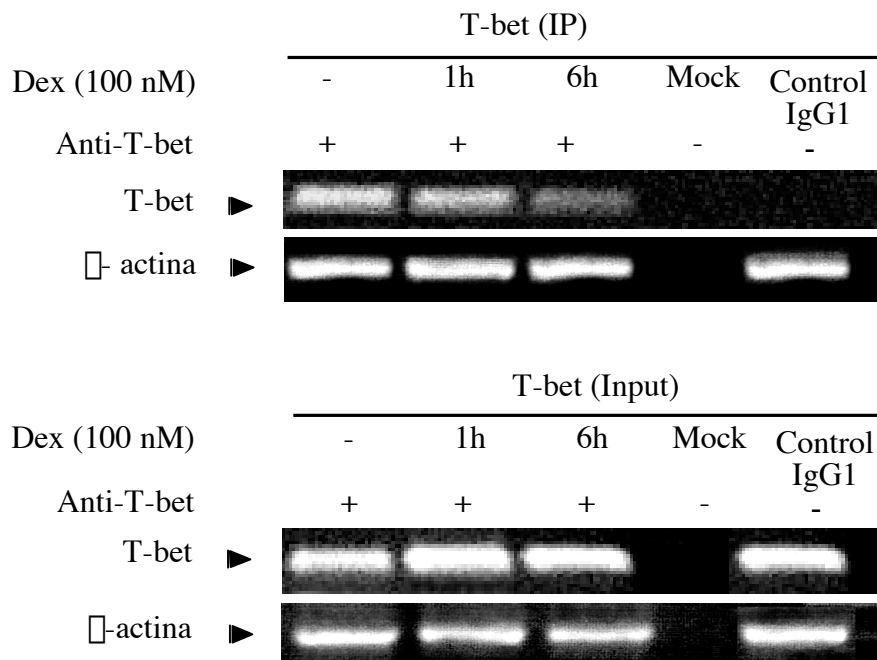
Para caracterizar más profundamente el mecanismo de inhibición por GC de la actividad de T-bet, analizamos el efecto de GC sobre la unión de T-bet al DNA *in vitro* utilizando ensayos de EMSA. Utilizamos los sitios de pegado de T-bet como oligonucleótidos doble cadena y las células EL-4 cotransfectadas con los vectores de expresión del GR y T-bet (Fig. 35). Vemos que el tratamiento con Dex produce una marcada disminución en la capacidad de T-bet de

unirse al DNA. Como control de competición por el pegado a los oligonucleótidos marcados radiactivamente se incluye un exceso (500X) de los oligonucleótidos de T-bet no marcados. La identidad del complejo se determinó utilizando el anticuerpo anti-T-bet. Vemos que la unión al DNA de T-bet es inhibida por GC.

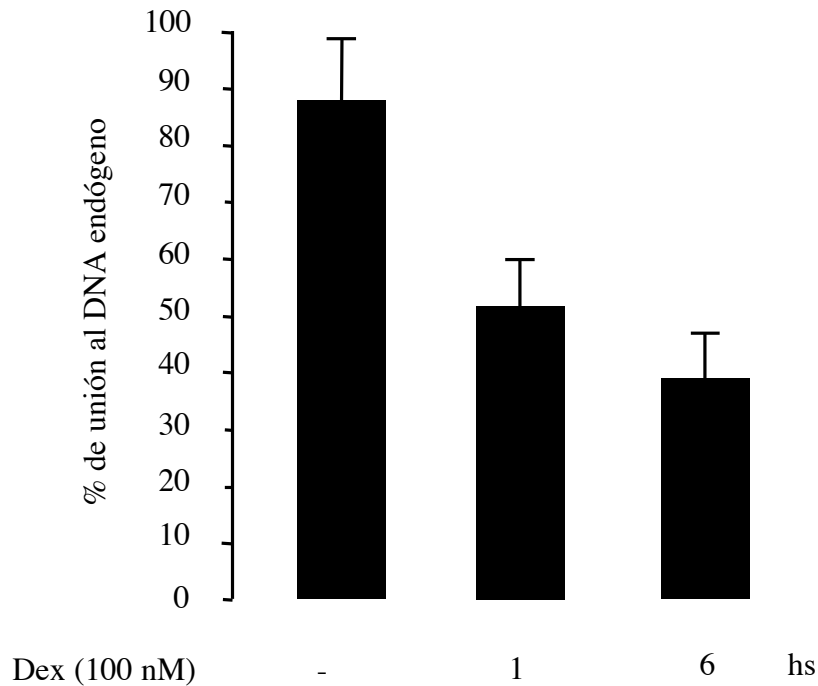


**Figura 35. Los GC inhiben la unión de T-bet al DNA *in vitro*.** La línea celular EL-4 fue transfectada con 20  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) y 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron tratadas durante 6 hs con dexametasona (Dex, 100 nM) bajo condiciones activantes usando ionomicina 1  $\mu$ M y PMA 0.1  $\mu$ M. El EMSA y las reacciones de competición fueron realizadas usando los oligonucleótidos que contienen los sitios de respuesta de T-bet marcados radiactivamente y 20  $\mu$ g de los extractos nucleares de las células EL-4. Para las reacciones de competición, se incluyó en la mezcla de reacción un exceso (500X) de los oligonucleótidos de T-bet no marcados. El ensayo se realizó utilizando 500 ng de poly (dI-dC)(dI-dC) en el buffer de reacción. Para los ensayos de supershift, los extractos nucleares fueron preincubados con 1  $\mu$ g del anticuerpo anti-T-bet. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

Para corroborar que la acción inhibitoria de los GC sobre la unión de T-bet a sus sitios de respuesta en el DNA también ocurre en el contexto del plegado cromatínico *in vivo*, realizamos ensayos de CHIP. Para ello, la línea EL-4 fue cotransfectadas con los vectores de expresión del GR y T-bet bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad para los ensayos de EMSA. La inmunoprecipitación de la cromatina a partir de células tratadas con Dex utilizando el anticuerpo anti-T-bet, revela que existe una potente inhibición de la capacidad de pegado de T-bet (Fig. 36 y 37). El sitio de unión al DNA de T-bet no es inmunoprecipitado utilizando el control de isotipo IgG<sub>1</sub>, mostrando la especificidad del ensayo. Por lo tanto, estos resultados se complementan con los resultados obtenidos *in vitro* en el ensayo de EMSA y muestran la habilidad de los GC para interferir con la unión de T-bet a sus sitios de pegado en el DNA.



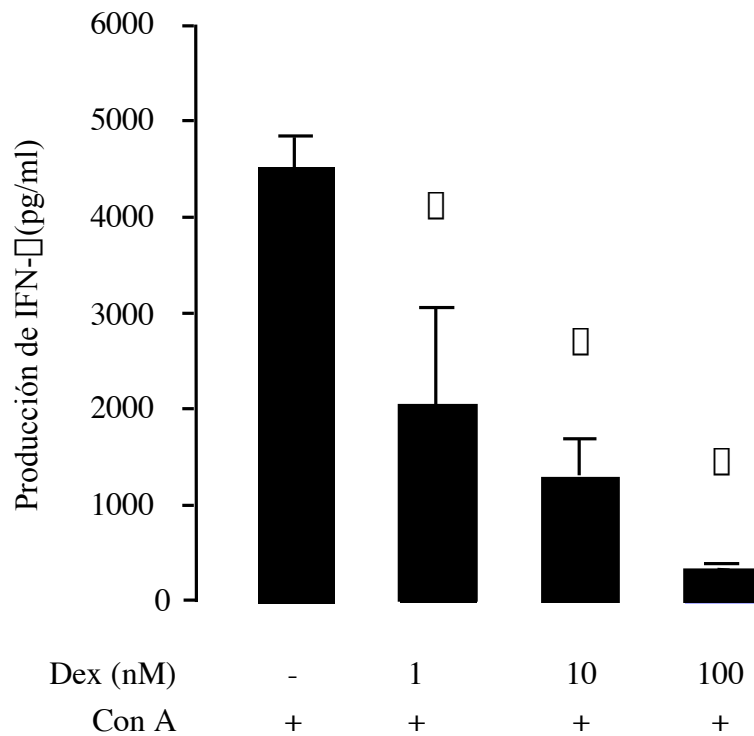
**Figura 36. Los GC inhiben el pegado de T-bet a sus sitios en la cromatina.** La línea celular EL-4 fue transfectada utilizando 20  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) y 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron tratadas durante 1 o 6 hs con dexametasona (Dex, 100 nM) bajo condiciones activantes utilizando ionomicina 1  $\mu$ M y PMA 0.1  $\mu$ M para la activación de T-bet. Para el ensayo de CHIP, las células EL-4 fueron fijadas con formaldehído durante 10 minutos. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con el anticuerpo anti-T-bet (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) en combinación con bolitas de Proteína A Sepharosa. También se realizaron controles de carga o Inputs los cuales se llevaron a cabo sin el paso de inmunoprecipitación. El DNA extraído fue usado para el análisis por PCR. Los controles denominados Mock, fueron llevados a cabo sin los anticuerpos. También se agrega un control utilizando una IgG<sub>1</sub> no específica. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.



**Figura 37. Análisis semicuantitativo de la inhibición por GC del pegado de T-bet a sus sitios en la cromatina.** Se muestra el análisis semicuantitativo del producto de PCR obtenido en la Figura 36 normalizado por el control de carga o Input y  $\beta$ -actina. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

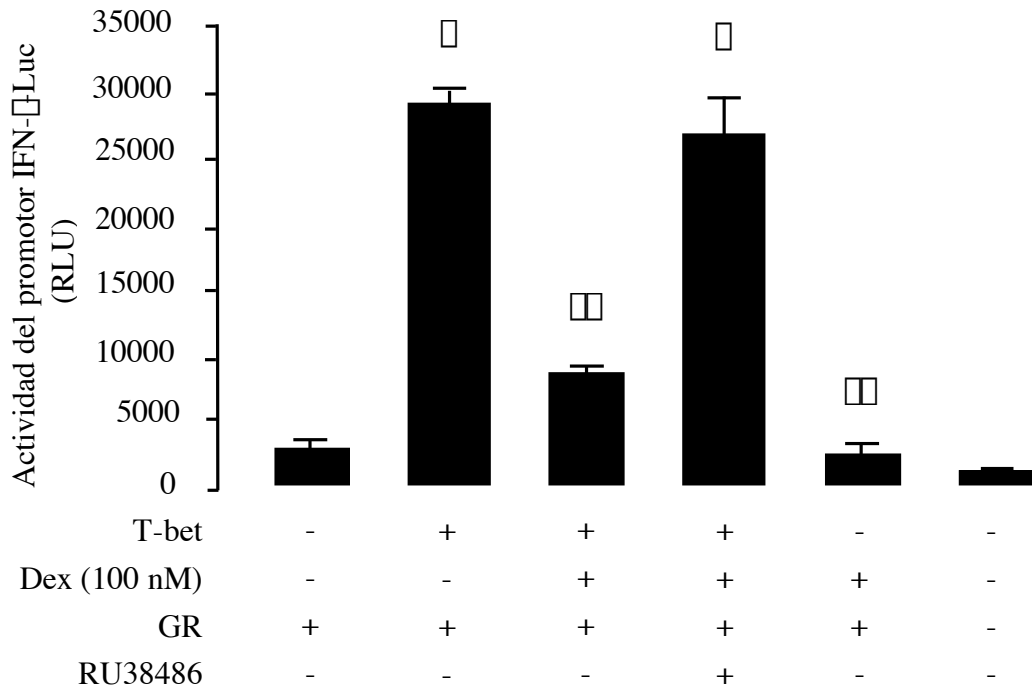
#### **IV.1.5. Los Glucocorticoides inhiben la actividad transcripcional de T-bet sobre el promotor de Interferon- $\gamma$**

Investigamos la relevancia funcional del descubrimiento de la regulación inhibitoria de los GC sobre el FT T-bet, utilizando un promotor central para el sistema inmune y que además es clave para la diferenciación Th1 y que es controlado por T-bet, el promotor de IFN- $\gamma$ . Primero confirmamos que los GC inhiben la producción de IFN- $\gamma$  en los cultivos de esplenocitos de manera dosis dependiente (Fig. 38), como fue previamente informado (Boumpas et al., 1991; Boumpas et al., 1993; Braun et al., 1997).



**Figura 38. Los GC inhiben la producción de IFN- $\gamma$ .** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 1, 10, 100 nM) durante 24 hs. Luego se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos para medir la producción de IFN- $\gamma$  siguiendo las instrucciones del proveedor por ELISA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p<0.001 vs. Con A, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestran uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

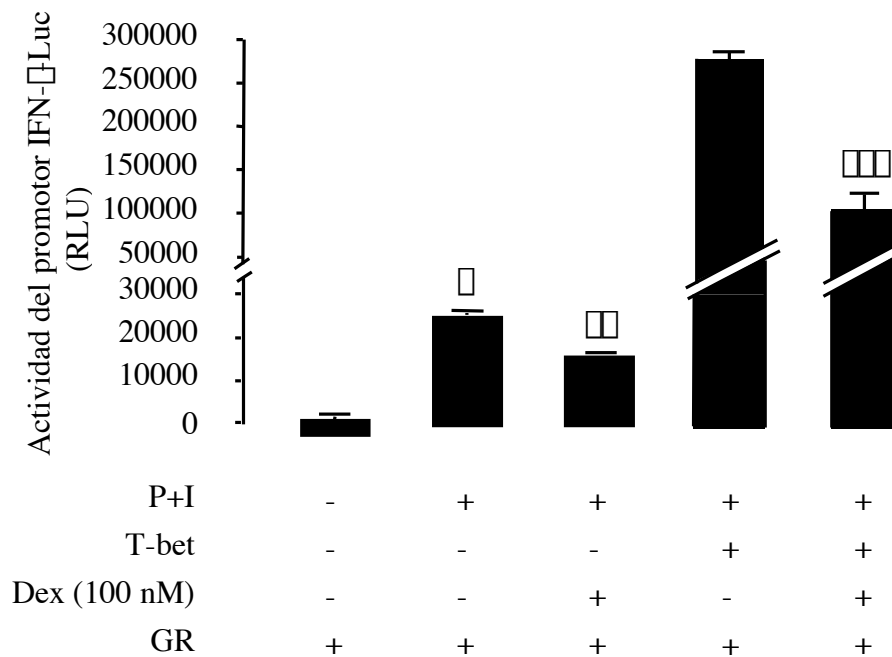
Para poder investigar el rol de los GC en la regulación de la actividad transcripcional de T-bet sobre el promotor de IFN- $\gamma$  las células EL-4 fueron transfectadas con una construcción que abarca -3447 pb del promotor de IFN- $\gamma$  clonado río arriba del gen de la luciferasa junto con el vector de expresión del GR. La sobreexpresión de T-bet, resultó en un aumento de casi siete veces de la actividad del promotor y la cotransfección del GR en presencia de Dex lleva a una potente inhibición de esta inducción (60 $\pm$ 5% de inhibición respecto a Dex 100 nM) (Fig. 39). El antagonista específico del receptor, RU38486, confirma la participación específica del GR.



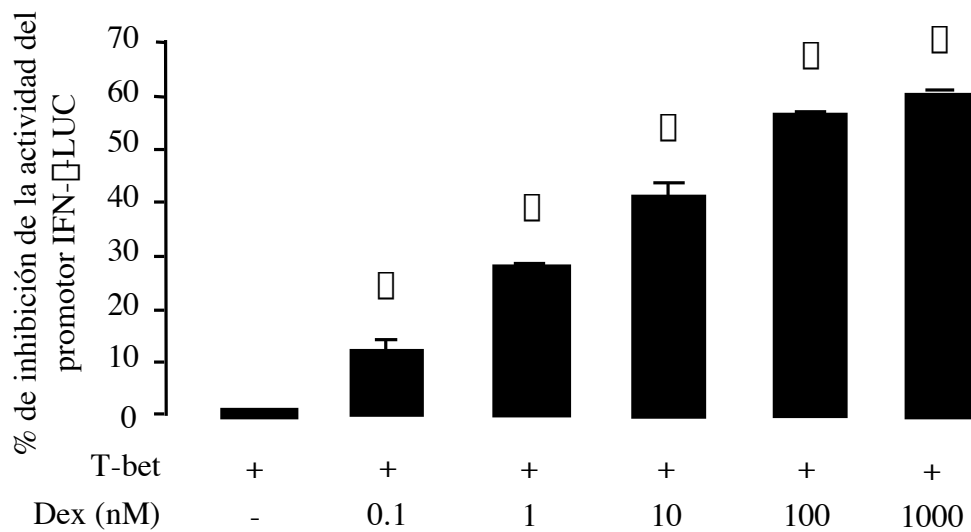
**Figura 39. Los GC inhiben la actividad del promotor de IFN- $\gamma$  inducida por T-bet.** La línea celular EL-4 fue transfectada con 9  $\mu$ g del reportero del promotor de IFN- $\gamma$  clonado río arriba del gen de la luciferasa (IFN- $\gamma$ -Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR), en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet). Luego de 16 hs en el medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM) y con (+) o sin (-) el antagonista específico del GR, RU38486 (1  $\mu$ M). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4, A:  $\square$  p<0.001 vs. basal sin T-bet,  $\square$  p<0.001 vs. T-bet sin Dex, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

Para analizar si los GC también inhiben la actividad de T-bet en condiciones de activación, se realizaron los mismos ensayos de transfección pero en condiciones activantes utilizando ionomicina (1  $\mu$ M) y PMA (0.1  $\mu$ M). Vemos que también en estas condiciones los GC inhiben la actividad transcripcional de T-bet sobre el promotor de IFN- $\gamma$  (Fig. 40). La figura 41 muestra que la inhibición mediada por GC de la actividad del promotor IFN- $\gamma$  inducida por T-bet es dosis dependiente.





**Figura 40. Los GC inhiben la actividad del promotor de IFN- $\gamma$  inducida por T-bet en condiciones de activación.** La línea celular EL-4 fue transfectada con 9  $\mu$ g del reportero del promotor de IFN- $\gamma$  clonado río arriba del gen de la luciferasa (IFN- $\gamma$ Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR), en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet). Luego de 16 hs en el medio de cultivo, las células fueron estimuladas bajo condiciones activantes utilizando ionomicina 1  $\mu$ M y PMA 0.1  $\mu$ M durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM) y con (+) o sin (-) el antagonista específico del GR, RU38486 (1  $\mu$ M). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU), y como la media  $\pm$  SEM (□ p<0.01 vs. basal, □ p<0.01 vs. P+I, □ p<0.01 vs. P+I+T-bet, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.



**Figura 41. Los GC inhiben la actividad del promotor de IFN- $\gamma$  inducida por T-bet de manera dosis dependiente.** La línea celular EL-4 fue transfectada con 9  $\mu$ g del reportero del promotor de IFN- $\gamma$  clonado río arriba del gen de la luciferasa (IFN- $\gamma$ Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR), en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-T-bet (T-bet). Luego de 16 hs en el medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 0.1, 1, 10, 100 o 1000 nM). Cada valor es normalizado a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados son expresados como % de inhibición de la actividad del promotor de IFN- $\gamma$  estimulado por T-bet ( $n = 4$ ,  $B$ :  $p < 0.001$  vs. T-bet sin dexamethasone=0%, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

---

## PARTE B

---

### IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN T HELPER 2, GATA-3

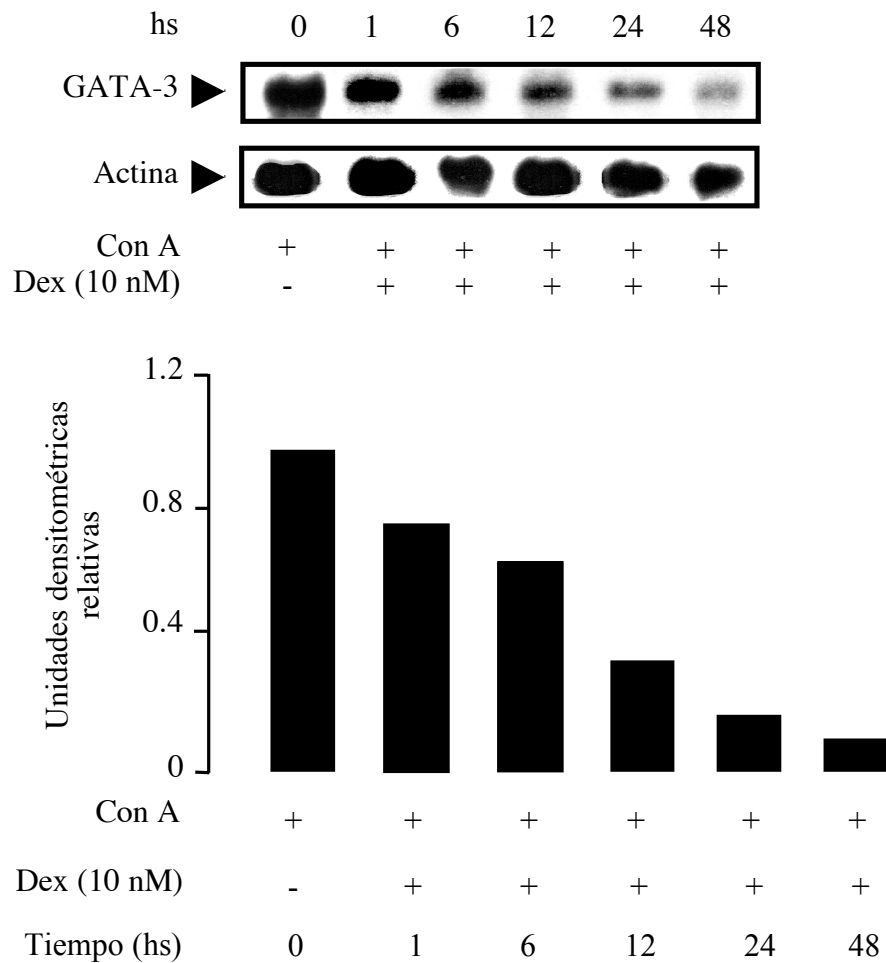
#### IV.2.1. Los Glucocorticoides inhiben la expresión del RNAm de GATA-3 y esta inhibición es revertida por la citoquina diferenciadora T helper 2 IL-4

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la regulación por GC del FT GATA-3 clave para la diferenciación Th2 y su interacción con citoquinas inmunomodulatorias.

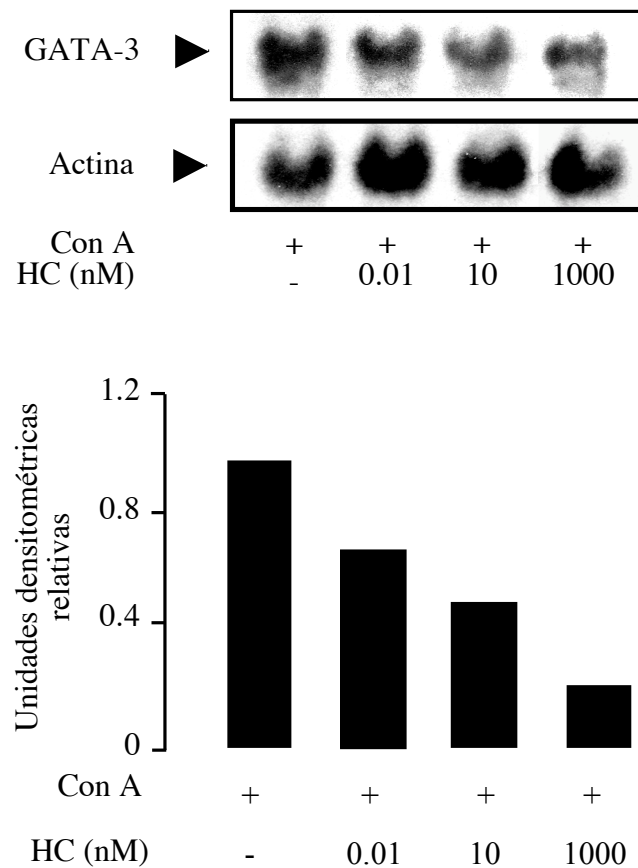
Para ello realizamos experimentos de Northern Blot en cultivos primarios de esplenocitos de ratón estimulados con Con A (Mitógeno T) (2.5  $\mu$ g/ml) y co-estimulados con los GC Dex (sintético) e HC (natural) en dosis altas (1000 nM) y bajas (0.01 nM) y a tiempos cortos (1 hs) y largos (48 hs) en presencia o ausencia de IL-4 (10 ng/ml). Observamos que Dex inhibe la expresión del RNAm de GATA-3 tanto a tiempos cortos como tiempos largos (Fig. 42).

Como mencionamos en la sección IV.1.1, decidimos trabajar a tiempos cortos para descartar que el efecto inhibitorio de GC, se deba a la inhibición de la síntesis de citoquinas diferenciadoras Th2 como IL-4, las cuales a su vez son capaces de inducir la expresión de GATA-3 (Franchimont et al., 1998; Seki et al., 2004).

A su vez, trabajamos con ambos tipos de GC (Dex e HC) a dosis altas y bajas debido a que como explicamos con anterioridad en la sección IV.1.1, se ha reportado que el efecto de los GC en la diferenciación depende no solo del tiempo de aplicación sino también del tipo y dosis de GC usado. Vemos que tanto Dex como HC a dosis altas y bajas y a tiempos cortos y largos, inhiben la expresión del RNAm de GATA-3 (Fig. 43).

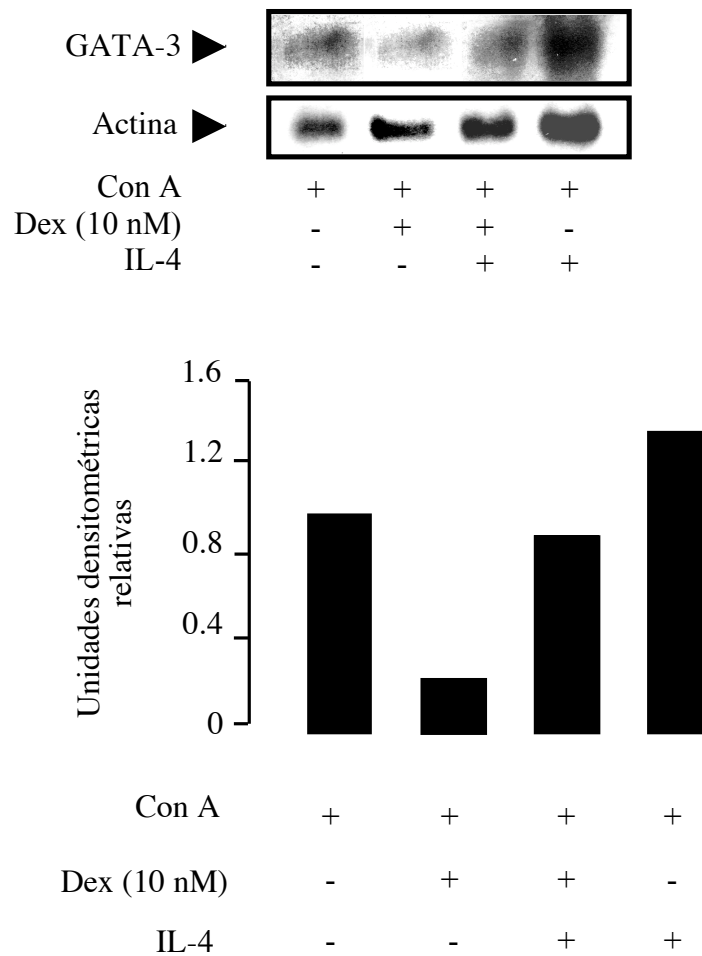


**Figura 42: Los GC inhiben la expresión del RNAm de GATA-3 a tiempos largos y cortos.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 48 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 10 nM) durante las últimas 1, 6, 12, 24 y 48 hs de incubación. Luego se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de GATA-3 por Northern Blot (20  $\mu$ g por calle). Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a GATA-3. Se utilizó la señal de  $\beta$ -actina como control. La intensidad de la señal que corresponde a GATA-3 o a  $\beta$ -actina fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como intensidades relativas de GATA-3 respecto a los niveles de RNAm de  $\beta$ -actina. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.



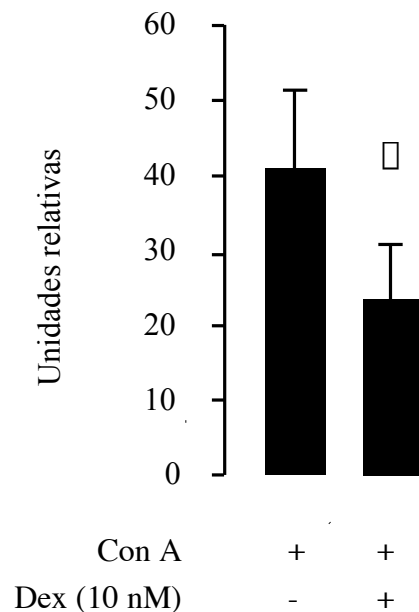
**Figura 43: GC inhiben la expresión del RNAm de GATA-3 tanto a dosis altas como bajas.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide hidrocortisona (HC, 0.01-1000 nM) durante 24 hs. Luego, se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de GATA-3 por Northern Blot (20  $\mu$ g por calle). Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a GATA-3. Se utilizó la señal de  $\beta$ -actina como control. La intensidad de la señal que corresponde a GATA-3 o a  $\beta$ -actina fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como intensidades relativas de GATA-3 respecto a los niveles de RNAm de  $\beta$ -actina. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

Como IL-4 es una citoquina clave para la diferenciación Th2, capaz de inducir la expresión de GATA-3, decidimos analizar el efecto de IL-4 sobre la inhibición mediada por GC de la expresión de GATA-3. En la Figura 44 podemos observar que IL-4 revierte la inhibición mediada por GC de la expresión de GATA-3.



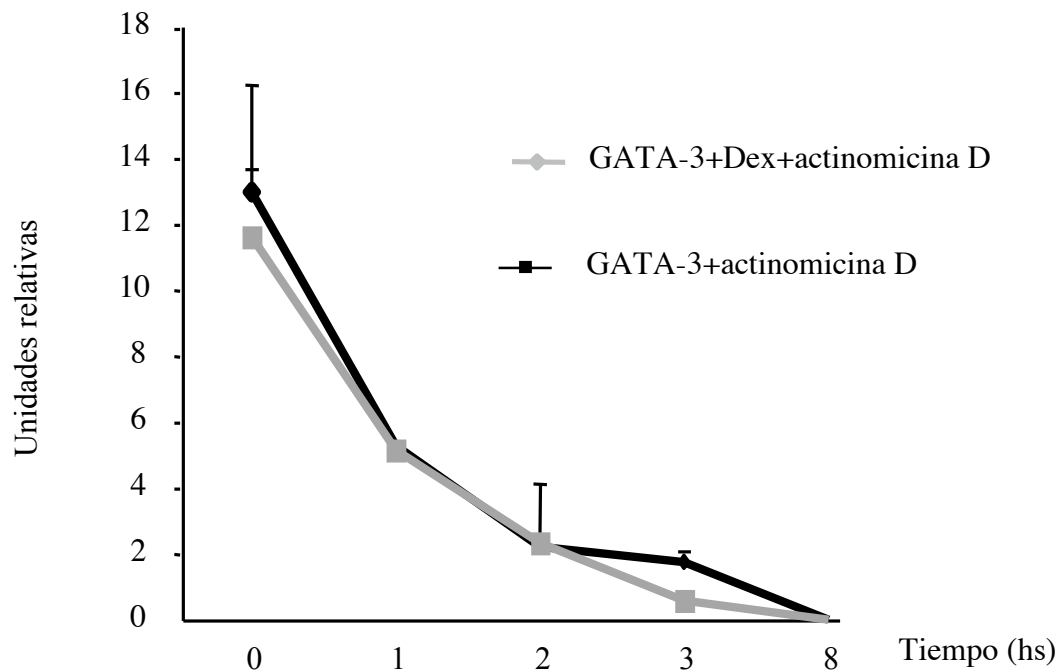
**Figura 44: La inhibición mediada por GC de la expresión del RNAm de GATA-3 es revertida por IL-4.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 10 nM) durante 24 hs e IL-4 (10 ng/ml). Luego se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de GATA-3 por Northern Blot (20  $\mu$ g por calle). Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a GATA-3. Se utilizó la señal de  $\beta$ -actina como control. La intensidad de la señal que corresponde a T-bet o a  $\beta$ -actina fueron cuantificadas por densitometría y expresadas como intensidades relativas de T-bet respecto a los niveles de RNAm de  $\beta$ -actina. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

A continuación, confirmamos de manera cuantitativa por la técnica de PCR en tiempo real la inhibición por GC de la expresión del RNAm de GATA-3 en relación a la expresión de  $\beta$ -actina y confirmamos los datos obtenidos por Northern Blot (Fig. 45). Obtuvimos resultados similares a 2, 6, 12, y 48 (datos no mostrados).



**Figura 45. Los GC inhiben la expresión del RNAm de GATA-3. Análisis por PCR en tiempo real.** Se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de GATA-3 por PCR en tiempo real en exactamente las mismas condiciones que se utilizaron para el Northern Blot (Fig. 41) utilizando Platinum SYBR Green 1 en 50  $\mu$ l de volumen final de reacción por cuadruplicado para cada DNAc. Las muestras fueron cuantificadas usando curvas standard relativas para cada reacción de amplificación y los resultados fueron normalizados al control interno de  $\beta$ -actina. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 3, B:  $\square$  p<0.001 vs. Con A, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

Para poder determinar si la disminución de la expresión del RNAm de GATA-3 mediada por GC se debe a un efecto directo de los GC sobre la transcripción de GATA-3 o se debe a que los GC inducen la degradación del mensajero, decidimos llevar a cabo los experimentos de expresión en presencia del inhibidor de la transcripción, actinomicina D. En la Figura 46 vemos que la inhibición no se debe a una disminución de la estabilidad del RNAm si no más bien a un efecto sobre la transcripción ya que no se observan diferencias debido a la acción de Dex sobre la inhibición con actinomicina D.



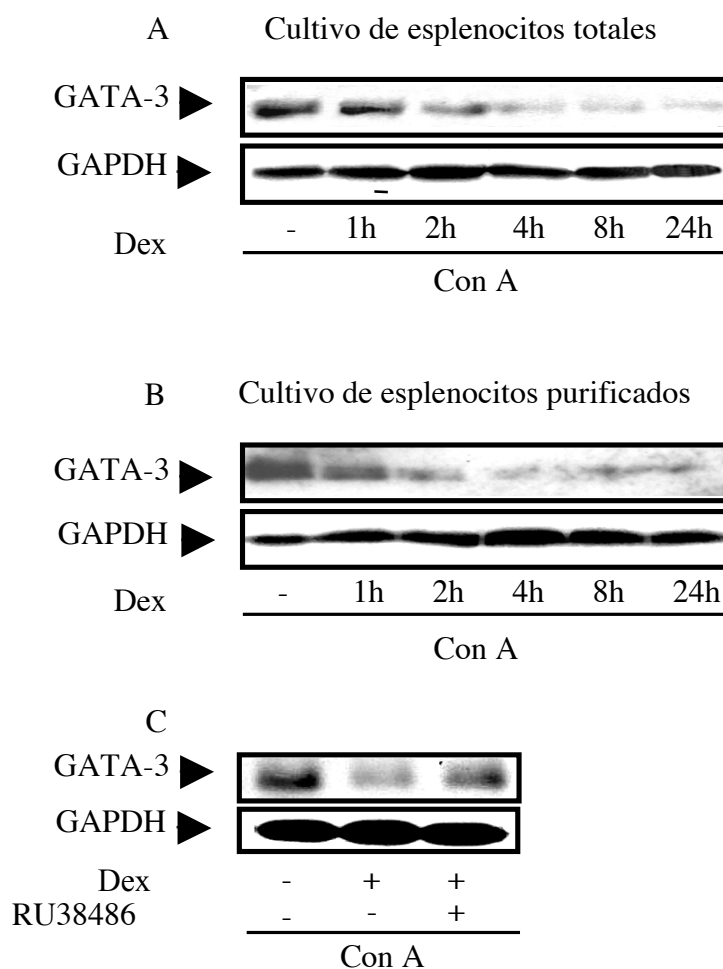
**Figura 46. Los GC no inducen la degradación de GATA-3.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 10 nM) durante 1, 2, 3 y 8 hs, precedido por 15 minutos de tratamiento con actinomicina D (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Luego se preparó el RNAm de los cultivos de esplenocitos para el análisis de la expresión del RNAm de GATA-3 por PCR en tiempo real en exactamente las mismas condiciones que se utilizaron para el Northern Blot utilizando Platinum SYBR Green 1 en 50  $\mu\text{l}$  de volumen final de reacción por cuadruplicado para cada DNAc. Las muestras fueron cuantificadas usando curvas standard relativas para cada reacción de amplificación, y los resultados fueron normalizados al control interno de  $\beta$ -actina. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.2.2. Los Glucocorticoides inhiben la síntesis proteica de GATA-3

Para poder determinar si la inhibición mediada por GC de la expresión del RNAm de GATA-3 es acompañada de una disminución de sus niveles proteicos, realizamos ensayos de Western Blot en cultivos primarios de esplenocitos de ratón totales y purificados (enriquecidos en linfocitos T) (Fig. 47 A y B), estimulados con Con A por 24 hs en presencia de Dex (100 nM) durante las últimas 1, 2, 4, 8 y 24 hs de incubación.

Observamos la inhibición de la síntesis proteica de GATA-3 en presencia de GC. El antagonista específico del GR, RU38486, revirtió la inhibición, probando la especificidad de la acción del GR (Fig. 47 C).



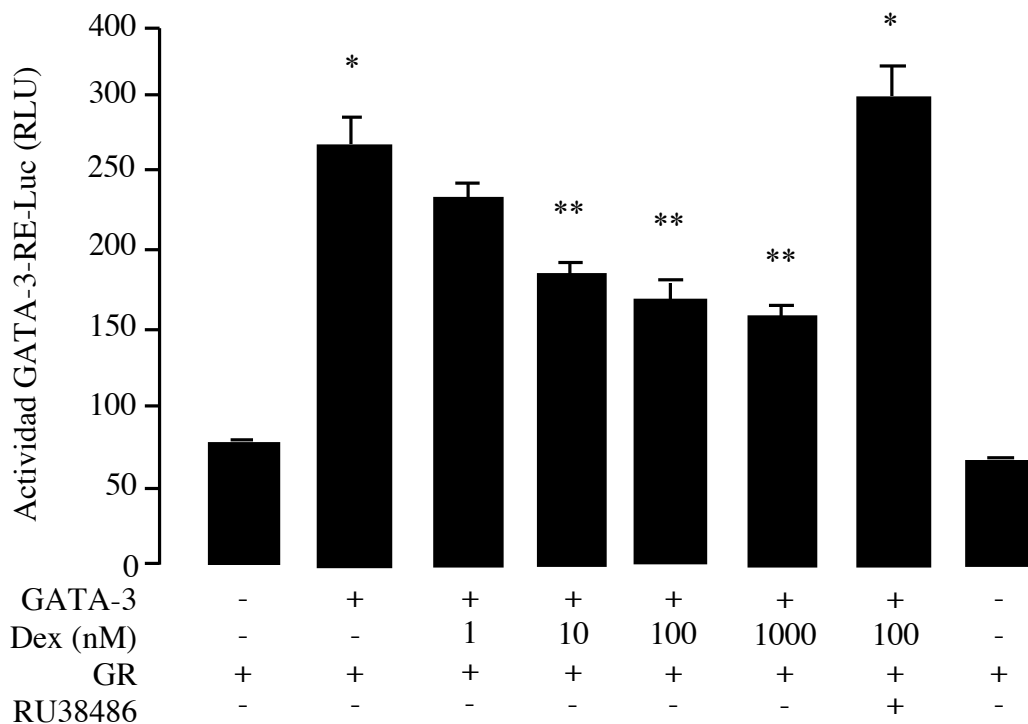


**Figura 47. Los GC inhiben los niveles proteicos de GATA-3.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón totales y purificados fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 100 nM) durante las últimas 1, 2, 4, 8 y 24 hs de incubación. Se agregó al cultivo el antagonista específico del receptor de glucocorticoides RU38486 (1  $\mu$ M), 30 minutos antes del tratamiento de las células con dexametasona (100 nM). Luego se preparó el lisado de las células para el análisis por Western Blot. Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a GATA-3 (65 kDa). Se utilizó la señal de GAPDH como control de carga. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.2.3. Los Glucocorticoides inhiben la actividad transcripcional de GATA-3

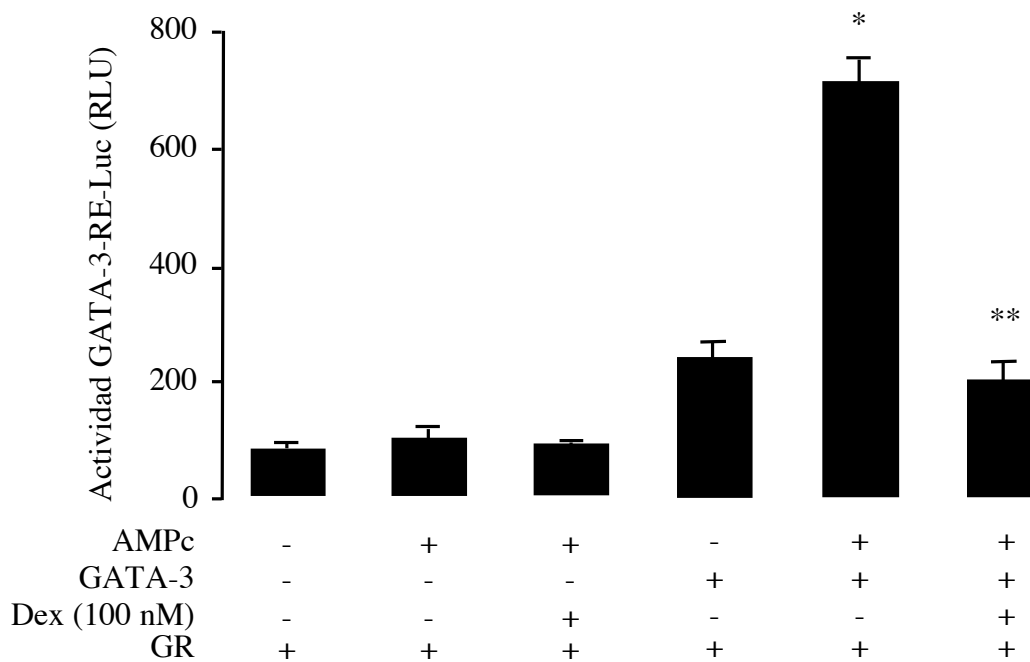
A continuación, analizamos si los GC también regulan la actividad transcripcional de GATA-3. Para ello, utilizamos una construcción reportera que contiene las secuencias oligonucleotídicas de los elementos de respuesta de GATA-3 descritos en el promotor de IL-5 clonados río arriba del gen de la luciferasa (GATA-3-RE-Luc). La transfección de la línea celular EL-4 con GATA-3-RE-Luc y el vector de expresión de GR (CMV-hGR) en presencia del vector de

expresión de GATA-3 (pcDNA3-GATA-3) mostró un aumento de casi cuatro veces en la actividad del reportero de GATA-3 (Fig. 48). La cotransfección con GR en presencia de Dex, produjo una inhibición dosis dependiente de la actividad transcripcional de GATA-3 ( $33 \pm 3\%$  de inhibición respecto a Dex 100 nM). La reversión de la inhibición utilizando el antagonista específico de GR, el RU38486 muestra que el GR esta directamente involucrado en la inhibición mediada por GC de la actividad transcripcional de GATA-3. Se obtuvieron resultados similares en la línea celular Jurkat (datos no mostrados).



**Figura 48. Los GC inhiben la actividad transcripcional de GATA-3.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g de un plásmido reportero el cual contiene los elementos de respuesta de GATA-3 río arriba del gen de la luciferasa (GATA-3-RE-Luc) en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 1, 10, 100 y 1000 nM) y con el antagonista del receptor de glucocorticoides RU38486 (1  $\mu$ M). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p < 0.001 vs. basal sin Dex,  $\square$  p < 0.001 vs. GATA-3 sin Dex, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos con resultados similares.

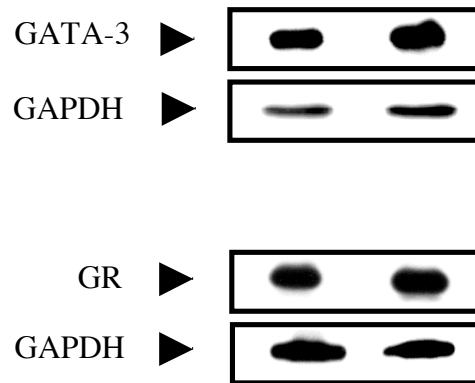
Para analizar si los GC inhiben la actividad transcripcional de GATA-3 en condiciones de activación, se realizaron los mismos ensayos de transfección pero en condiciones activantes utilizando AMPc (1  $\mu$ M). AMPc potencia la actividad de GATA-3 sobre sus elementos de respuesta (Fig. 49). Además, vemos que los GC inhiben fuertemente la actividad transcripcional de GATA-3 en estas condiciones.



**Figura 49. Los GC inhiben fuertemente la actividad transcripcional de GATA-3 en condiciones de activación.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g de un plásmido reportero el cual contiene los elementos de respuesta de GATA-3 río arriba del gen de la luciferasa (GATA-3-RE-Luc) en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas bajo condiciones de activación utilizando AMPc (1  $\mu$ M) durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4, \*p<0.001 vs. GATA-3, \*\* p<0.001 vs. GATA-3 con AMPc, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos con resultados similares.

Como la inhibición de la actividad de GATA-3 podría ser el resultado de una disminución de la expresión proteica de GATA-3 mediada por la acción de GC sobre el promotor pcDNA3 que rige la expresión del vector de GATA-3, analizamos los niveles proteicos de GATA-3 por Western Blot bajo las mismas condiciones experimentales y observamos que los GC no afectan

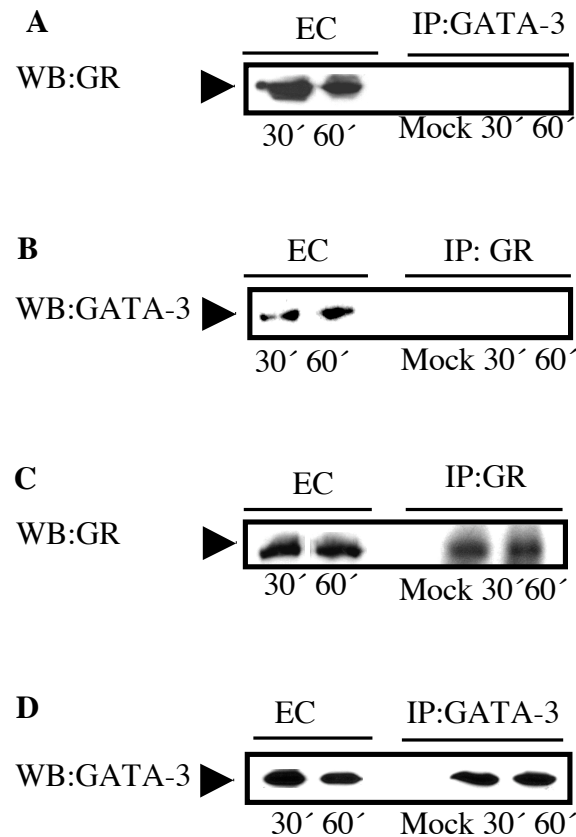
los niveles de expresión de GATA-3 (Fig. 50). Como no se observa una inhibición de los niveles proteicos de GATA-3, concluimos que el efecto de los GC es directamente sobre la actividad transcripcional de GATA-3. Además observamos que los GC tampoco afectan los niveles de expresión del GR (Fig. 50).



**Figura 50. Regulación por GC de la expresión proteica del plásmido pcDNA3-GATA-3.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron estimuladas bajo condiciones de activación utilizando AMPc (1  $\mu$ M) durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM). Se preparó el lisado de las células para el análisis por Western Blot. Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a GATA-3 y a GR (55 kDa para GATA-3 y 94 kDa para GR). Se utilizó la señal de GAPDH como control de carga. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.2.3.1. El receptor de glucocorticoides y GATA-3 no interaccionan físicamente

Con el objetivo de poder dilucidar el mecanismo molecular intrínseco involucrado en la inhibición de la actividad de GATA-3, realizamos experimentos de coimmunoprecipitación en las células EL-4 cotransfectadas con el vector de expresión del GR y de GATA-3. Como se observa en la Figura 51, el GR no coimmunoprecipita con GATA-3 ya sea cuando se utiliza para inmunoprecipitar el anticuerpo anti-GATA-3 o el anti-GR (Fig. 51 A y B). Se realizaron controles usando los mismos anticuerpos inmunoprecipitantes para mostrar que la inmunoprecipitación y el Western Blot para GATA-3 y GR fueron llevados a cabo correctamente (Fig. 51 C y D). También se incluye el análisis de los extractos crudos que fueron utilizados como controles para demostrar la presencia de GATA-3 y GR. Estos resultados muestran que no existe interacción proteína-proteína entre GR y GATA-3.

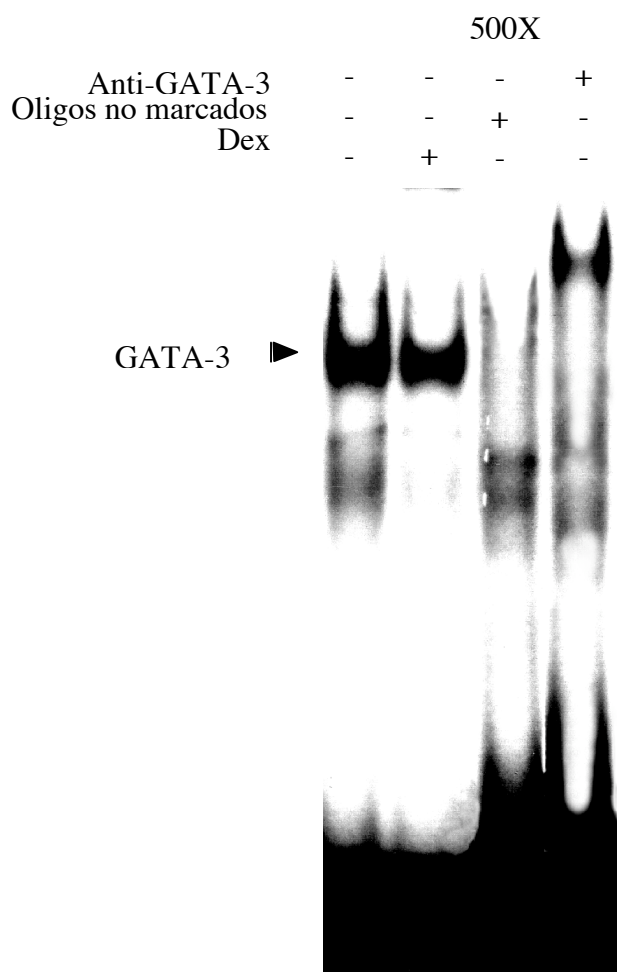


**Figura 51. El GR y GATA-3 no coimmunoprecipitan.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 20  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) y 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3) (A-D). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron tratadas durante 30 o 60 minutos con dexametasona (Dex, 100 nM) bajo condiciones activantes utilizando AMPc (1  $\mu$ M). Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con Proteína A-G Sepharosa en combinación con los siguientes anticuerpos (1  $\mu$ g/ml): A y D anti-GATA-3 B y C: anti-receptor de glucocorticoides (GR). Las fracciones inmunoprecipitadas y los extractos crudos (EC) fueron analizados por Western Blot (WB) (55 kDa para GATA-3 y 94 kDa para GR), como está descrito en Materiales y Métodos, usando los siguientes anticuerpos (100 ng/ml): A y C: anti-GR; B y D: anti-GATA-3; y luego incubados con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (dilución: 1:3000). Se incluyeron controles Mock realizados en las mismas condiciones pero en ausencia de extractos celulares. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.2.4. Los GC no inhiben la unión de GATA-3 a sus elementos de respuesta en el DNA

Para seguir caracterizando el mecanismo de inhibición mediado por GC de la actividad de GATA-3, analizamos el efecto de los GC sobre la unión de GATA-3 al DNA *in vitro* mediante

ensayos de EMSA. Utilizamos los sitios de pegado de GATA-3 como oligonucleótidos doble cadena y las células EL-4 cotransfectadas con los vectores de expresión del GR y GATA-3 (Fig. 52). Vemos que el tratamiento con Dex no inhibe la unión al DNA de GATA-3. Como control de competición se incluye un exceso (500X) de los oligonucleótidos de GATA-3 no marcados. La identidad del complejo se determinó utilizando el anticuerpo anti-GATA-3. Vemos que la unión al DNA de GATA-3 no es inhibida por GC.



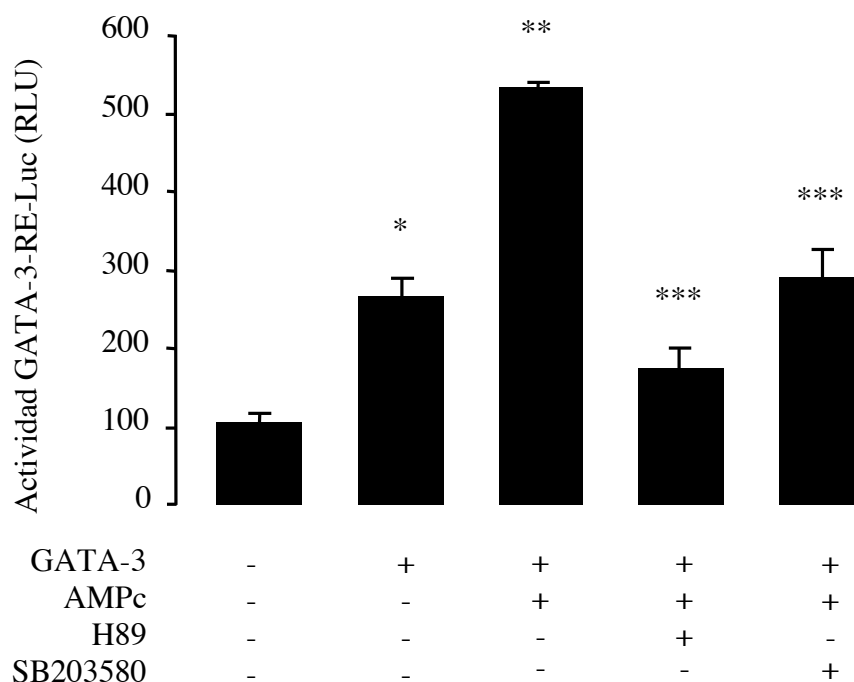
**Figura 52 Los GC no inhiben la unión de GATA-3 al DNA.** La línea celular EL-4 fue transfectada con 20  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) y 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron tratadas durante 6 hs con dexametasona (Dex, 100 nM) bajo condiciones activantes usando AMPc (1  $\mu$ M). El EMSA y las reacciones de competición fueron realizadas usando los oligonucleótidos que contienen los sitios de respuesta de GATA-3 marcados radiactivamente y 20  $\mu$ g de los extractos nucleares de las células EL-4. Para las reacciones de competición, se incluyó en la mezcla de reacción un exceso (500X) de los oligonucleótidos de GATA-3 no marcados. El ensayo se realizó utilizando 500 ng de poly (dI-dC)(dI-dC) en el buffer de reacción. Para los ensayos de supershift, los extractos nucleares fueron preincubados con 1  $\mu$ g del anticuerpo anti- GATA-3. Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

#### **IV.2.5. AMPc induce la actividad transcripcional de GATA-3 vía la señalización por proteín quinasa A (PKA) y la proteín quinasa activada por mitógenos p38.**

Dado que, a diferencia de lo que ocurre con T-bet, GATA-3 y GR no interaccionan físicamente y con el fin de dilucidar la existencia de otro posible mecanismo de inhibición de la actividad de GATA-3 por GC, decidimos analizar los caminos de señalización implicados en la actividad de GATA-3 y si los GC son capaces de inhibir alguna de estas vías.

En células CD4<sup>+</sup>, AMPc induce la producción de IL-5 a la vez que inhibe la producción de citoquinas Th1 incluyendo IL-12. (Betz y Fox, 1991; Chen et al., 2000a). Agentes que aumentan los niveles intracelulares de AMPc inducen fuertemente el gen y la producción de IL-5, siendo este gen fuertemente regulado por el FT GATA-3 (Betz y Fox, 1991; Siegel et al., 1995). Además, en líneas Th2 se ha demostrado que AMPc induce la actividad de p38 MAPK (independientemente de la activación de la PKA), la fosforilación de GATA-3 y la actividad de promotores dependientes de GATA-3 (Chen et al., 2000a). Por lo tanto, comenzamos investigando la participación de PKA y p38 MAPK en nuestro modelo.

La actividad transcripcional de GATA-3 sobre el reportero GATA-RE-Luc (que contiene sitios GATA-RE, demostrado en IV.2.3) fue incrementada al doble por el agregado de AMPc (1  $\mu$ M) (Fig. 53). El agregado de el inhibidor de la proteín quinasa A (PKA), H89, inhibió la actividad inducida por AMPc de GATA-3 demostrando que PKA está involucrada. Además, el agregado del inhibidor de p38 MAPK, SB203580, también mostró una fuerte inhibición, por lo que p38 MAPK también estaría involucrada en dicha actividad.



**Figura 53. AMPc induce la actividad transcripcional de GATA-3 vía PKA y p38 MAPK.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g de un plásmido reportero el cual contiene los elementos de respuesta de GATA-3 río arriba del gen de la luciferasa (GATA-3-RE-Luc) en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron pretratadas durante 1 h con el inhibidor de la proteín quinasa A, H89 (10  $\mu$ M) o con el inhibidor de la quinasa activada por mitógenos p38, SB203580 (10  $\mu$ M) y posteriormente estimulada durante 8 hs con AMPc (1  $\mu$ M). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p<0.001 vs. basal,  $\square$  p<0.001 vs. GATA-3,  $\square$  p<0.001 vs. GATA-3+AMPc, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos con resultados similares.

#### IV.2.6. Los Glucocorticoides inhiben la actividad transcripcional de GATA-3 inducida por AMPc inhibiendo la vía proteín quinasa A (PKA)-proteín quinasa activada por mitógenos p38

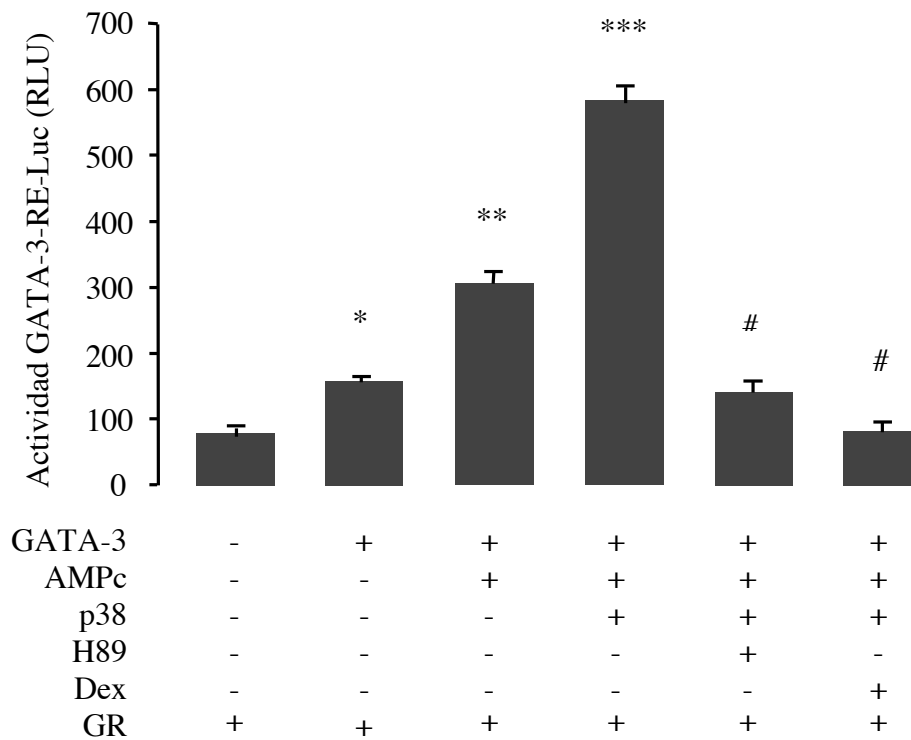
Para investigar si PKA y p38 están induciendo la actividad de GATA-3 de manera independiente o PKA activa p38 y esta a su vez induce la actividad de GATA-3, transfectamos la línea celular EL-4, con la construcción reportera GATA-3-RE-Luc y el vector de expresión



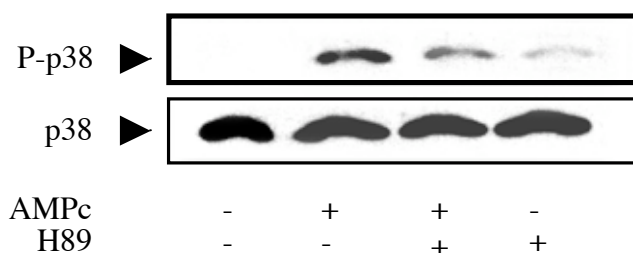
de GATA-3 (pcDNA3-GATA-3) en presencia o ausencia de el vector de expresión de p38 MAPK (pcEFL-p38). Vemos que p38 MAPK aumenta casi al doble la actividad de GATA-3 inducida por AMPc y que el agregado del inhibidor de PKA, H89 bloquea dicha inducción por lo que en nuestro modelo sería necesario la inducción de la PKA para que esta active a la p38 MAPK y esta a su vez aumente la actividad de GATA-3 sobre sus elementos de respuesta (Fig. 54).

Para investigar el rol de los GC en esta cascada de quinasas que culmina en un aumento de la actividad de GATA-3, a su vez cotransfectamos el vector de expresión del GR (CMV-hGR) en presencia de Dex (100 nM). Vemos que en presencia de Dex se inhibe por completo la actividad de GATA-3 inducida por p38 MAPK (Fig. 54) demostrando que los GC inhiben esta vía de activación de GATA-3.

Para confirmar que AMPc activa PKA y ésta a su vez induce la fosforilación de p38 MAPK (P-p38) realizamos ensayos de Western Blot en la línea celular EL-4 estimulada con AMPc en presencia o ausencia del inhibidor de la actividad de la PKA, H89 y medimos la expresión de P-p38 (Fig. 55). Vemos que AMPc induce la fosforilación de p38 MAPK y H89 la inhibe, confirmando que AMPc induce PKA que a su vez fosforila p38 MAPK.



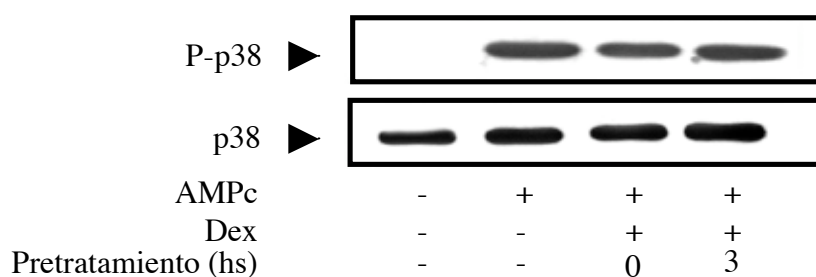
**Figura 54. Los GC inhiben la actividad de GATA-3 inducida por la activación de la PKA-p38 MAPK.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 9  $\mu$ g de un plásmido reportero el cual contiene los elementos de respuesta de GATA-3 río arriba del gen de la luciferasa (GATA-3-RE-Luc) en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 pcEFL-p38 (p38 MAPK) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron pretratadas durante 1 h con el inhibidor de la proteína quinasa A, H89 (10  $\mu$ M) y posteriormente estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM) y AMPc (1  $\mu$ M). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p<0.001 vs. basal sin Dex,  $\square$  p<0.001 vs. GATA-3,  $\square\square$  p<0.001 vs. GATA-3+AMPC, # p<0.001 vs. GATA-3+AMPC+p38 MAPK, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos con resultados similares.



**Figura 55. AMPc induce la fosforilación de p38 MAPK vía la activación de PKA.** La línea celular EL-4 fue pretratada durante 1 h con el inhibidor de la proteína quinasa A, H89 (10  $\mu$ M) y posteriormente estimuladas durante 25 minutos con AMPc (1  $\mu$ M). Luego se preparó el lisado de las células para el análisis por Western Blot. Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a P-p38 y p38 MAPK (bandas de 38 kDa con los anticuerpos anti P-p38 y p38 MAPK). Se utilizó la señal de p38 como control. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

#### IV.2.7. Los Glucocorticoides no inhiben la fosforilación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38

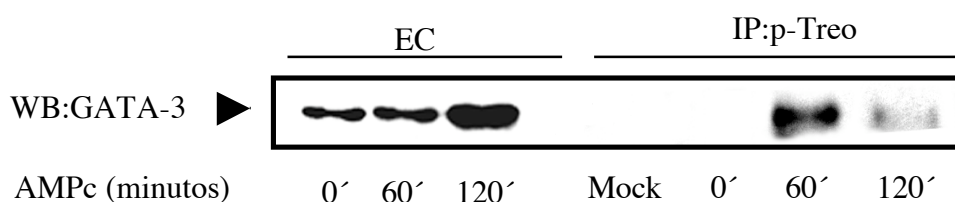
Para poder determinar si el mecanismo molecular implicado en la inhibición de la actividad transcripcional de GATA-3 por GC se debe a la inhibición de la fosforilación de p38 MAPK inducida por AMPc, transfectamos la línea EL-4 con el vector de expresión del GR (CMV-hGR) y realizamos ensayos de Western Blot en la línea estimulada con AMPc (1  $\mu$ M). Medimos la expresión de P-p38 en relación a la expresión de p38 MAPK (Fig. 56). Observamos que los GC no inhiben la fosforilación de p38 MAPK.



**Figura 56. Los GC no inhiben la fosforilación de p38 MAPK inducida por AMPc.** La línea celular EL-4 fue transfectada con 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR). Luego de 16 hs en el medio de cultivo, las células fueron pretratadas o no, durante 3 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM) y posteriormente estimuladas durante 25 minutos con AMPc (1  $\mu$ M). Luego se preparó el lisado de las células para el análisis por Western Blot. Se obtuvieron bandas únicas que corresponden a P-p38 y p38 MAPK (bandas de 38 kDa con los anticuerpos anti P-p38 y p38 MAPK). Se utilizó la señal de p38 como control. Se muestra uno de tres experimentos independientes con resultados similares.

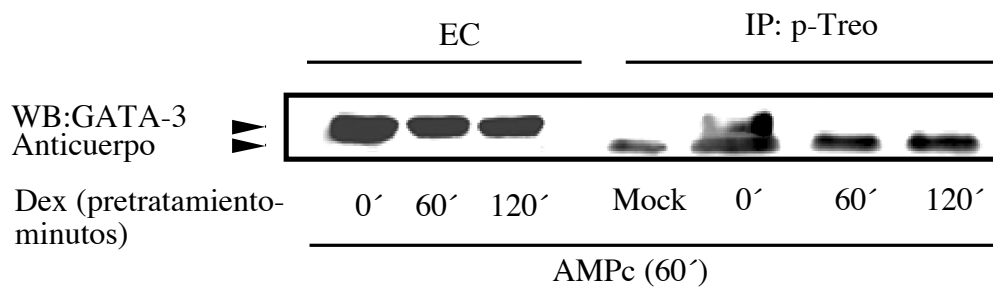
#### IV.2.8. Los Glucocorticoides inhiben la fosforilación de GATA-3

Teniendo en cuenta que los GC no son capaces de inhibir la fosforilación de p38 MAPK nos preguntamos si los GC inhiben la fosforilación de GATA-3. Para definir el tiempo óptimo de inducción de la fosforilación de GATA-3 (p-GATA-3) realizamos experimentos de inmunoprecipitación en las células EL-4 cotransfectadas con el vector de expresión GATA-3 (pcDNA3-GATA-3), en condiciones basales y estimuladas con AMPc (1  $\mu$ M) durante 1 y 2 hs (Fig. 57). Dado que p38 MAPK fosforila serinas o treoninas presentes en motivos serina-prolina o treonina-prolina, para inmunoprecipitar p-GATA-3 utilizamos el anticuerpo anti-fosfo-treonina y revelamos con el anticuerpo anti-GATA-3. Vemos que a 1 h de estímulo con AMPc obtenemos una señal óptima de p-GATA-3. También se incluye el análisis de los extractos crudos que fueron utilizados como controles para demostrar la presencia de GATA-3.



**Figura 57. AMPc induce la fosforilación de GATA-3.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron tratadas durante 60 o 120 minutos con AMPc (1  $\mu$ M). Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con Proteína A-G Sepharosa en combinación con el anticuerpo (0.5  $\mu$ g/ml) anti-fosfo-treonina (p-Treo). Las fracciones inmunoprecipitadas y los extractos crudos (EC) fueron analizados por Western Blot (WB) (55 kDa para GATA-3), como está descrito en Materiales y Métodos, usando anti-GATA-3 (100 ng/ml); y luego incubados con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugados con HRP (dilución: 1:3000). Se incluyeron controles Mock realizados en las mismas condiciones pero en ausencia de extractos celulares. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

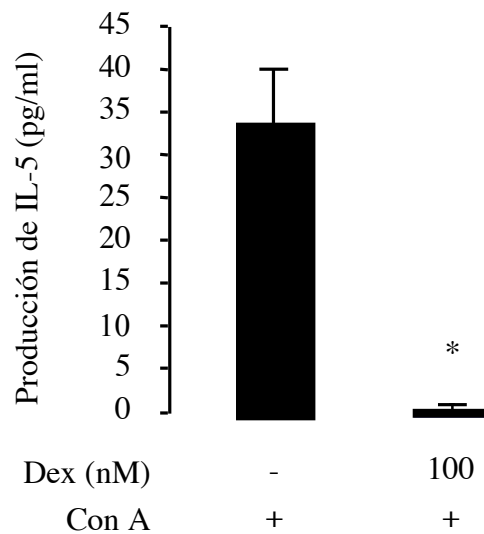
Luego realizamos los mismos ensayos de inmunoprecipitación pero transfectando los vectores de expresión de GATA-3 y del GR en presencia o ausencia de AMPc (1  $\mu$ M) durante 1h y pretratando con Dex (100 nM) durante 1 y 2 hs. También se incluye el análisis de los extractos crudos que fueron utilizados como controles para demostrar la presencia de GATA-3 y GR (datos no mostrados) (Fig. 58). Se observa que los GC inhiben la fosforilación de GATA-3.



**Figura 58. Los GC inhiben la fosforilación de GATA-3.** La línea celular EL-4 fue transfectada transientemente con 20  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR) y con 20  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3). Luego de 16 hs en medio de cultivo, las células fueron pretratadas durante 60 o 120 minutos con dexametasona (Dex, 100 nM) y luego durante 60 minutos con AMPc (1  $\mu$ M). Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados (IP) con Proteína A-G Sepharosa en combinación con el anticuerpo (0.5  $\mu$ g/ml) anti-fosfo-treonina (p-Treo). Las fracciones inmunoprecipitadas y los extractos crudos (EC) fueron analizados por Western Blot (WB) (55 kDa para GATA-3), como está descrito en Materiales y Métodos, usando anti-GATA-3 (100 ng/ml); y luego incubados con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugados con HRP (dilución: 1:3000). Se incluyeron controles Mock realizados en las mismas condiciones pero en ausencia de extractos celulares. Se muestra uno de dos experimentos independientes con resultados similares.

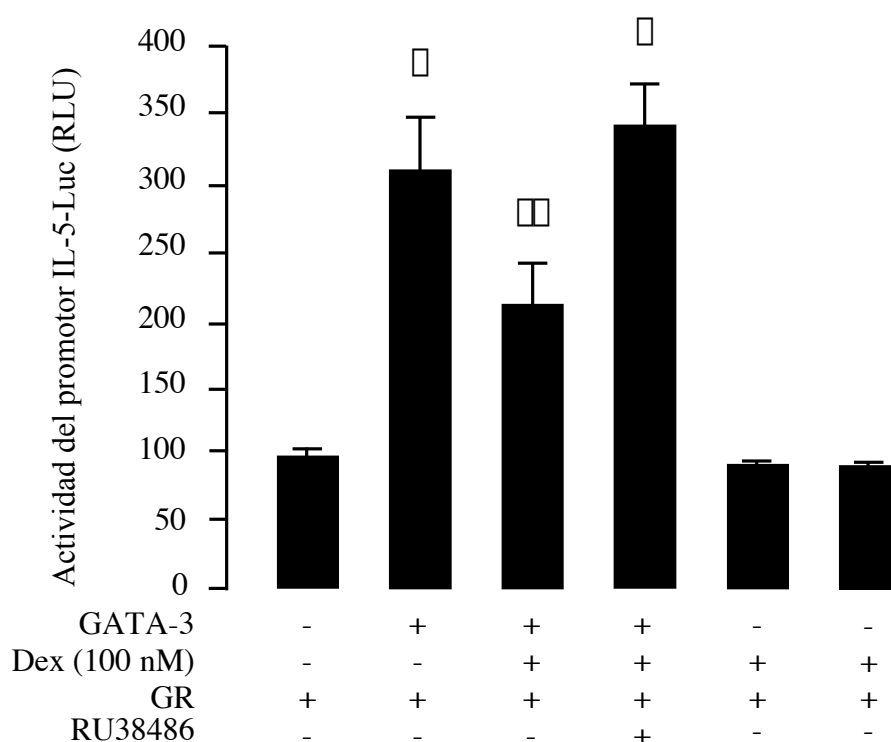
#### IV.2.9. Los GC inhiben la actividad transcripcional de GATA-3 sobre el promotor de IL-5

Investigamos la relevancia funcional del descubrimiento de la regulación inhibitoria de los GC sobre el FT GATA-3 utilizando un promotor central para el sistema inmune y que además es clave para la diferenciación Th2 y es regulado por GATA-3, el promotor de IL-5. Primero confirmamos que los GC son capaces de inhibir la producción de IL-5 en los cultivos primarios de esplenocitos (Fig. 59), como fue previamente informado (Mori et al., 1997b).



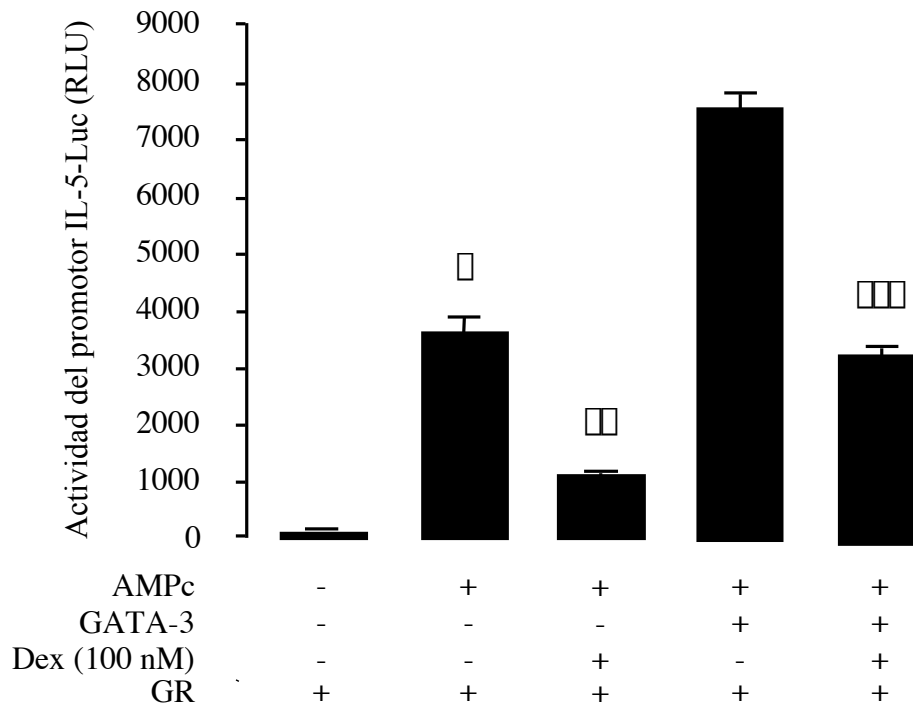
**Figura 59. Los GC inhiben la producción de IL-5.** Cultivos primarios de esplenocitos de ratón fueron activados con Con A (2.5  $\mu$ g/ml) durante 24 hs en presencia o ausencia del glucocorticoide dexametasona (Dex, 100 nM) durante 24 hs. Luego se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos para medir la producción de IL-5 siguiendo las instrucciones del proveedor por ELISA. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM (n = 4,  $\square$  p<0.001 vs. Con A, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestran uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

Para poder investigar el rol de los GC en la regulación de la actividad transcripcional de GATA-3 sobre el promotor de IL-5, las células EL-4 fueron transfectadas con una construcción que abarca -1200 pb del promotor de IL-5 clonado río arriba del gen de la luciferasa junto con el vector de expresión del GR. La sobreexpresión de GATA-3, resultó en un aumento de casi tres veces de la actividad del promotor, la cotransfección del GR en presencia de Dex lleva a una inhibición leve de esta inducción (30 $\pm$ 5% de inhibición respecto a Dex 100 nM) (Fig. 60). La reversión por el antagonista específico del receptor, RU38486, confirma la participación del GR.



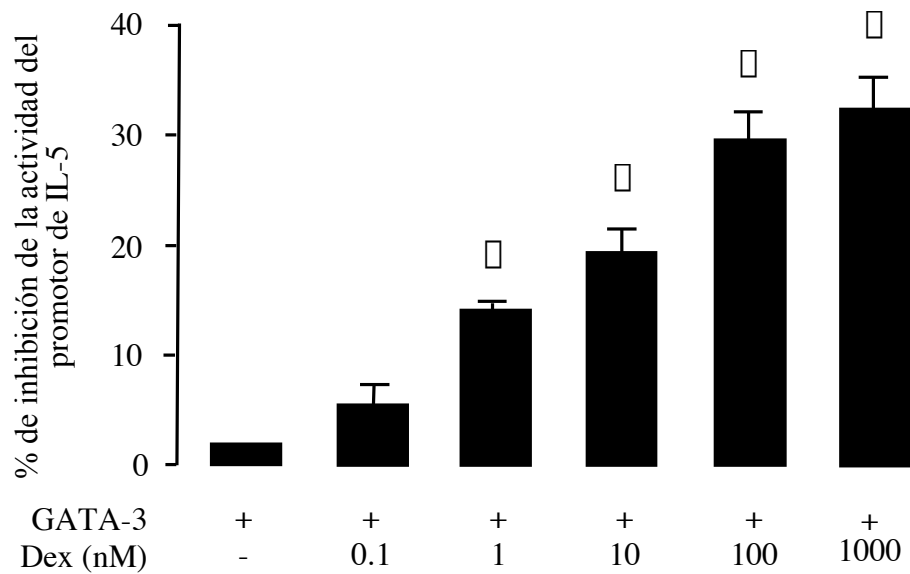
**Figura 60. Los GC inhiben la actividad del promotor de IL-5 inducida por GATA-3.** La línea celular EL-4 fue transfectada con 9  $\mu$ g del reportero del promotor de IL-5 clonado río arriba del gen de la luciferasa (IL-5-Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR), en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3). Luego de 16 hs en el medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM) y con (+) o sin (-) el antagonista específico del receptor de glucocorticoides the glucocorticoid RU38486 (1  $\mu$ M). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4;  $\square$  p<0.001 vs. basal sin GATA-3,  $\square$  p<0.001 vs. GATA-3 sin Dex, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

Para analizar si los GC también inhiben la actividad de GATA-3 en condiciones de activación, se realizaron los mismos ensayos de transfección pero en condiciones activantes utilizando AMPc (0.1  $\mu$ M). Vemos que también en estas condiciones los GC inhiben fuertemente la actividad transcripcional de GATA-3 sobre el promotor de IL-5 (Fig. 61). La Figura 62 muestra que la inhibición mediada por GC de la actividad del promotor IL-5 inducida por GATA-3 es dosis dependiente.



**Figura 61. Los GC inhiben la actividad del promotor de IL-5 inducida por GATA-3 en condiciones de activación.** La línea celular EL-4 fue transfectada con 9  $\mu$ g del reportero del promotor de IL-5 clonado río arriba del gen de la luciferasa (IL-5-Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR), en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3). Luego de 16 hs en el medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs en condiciones de activación utilizando AMPc (1  $\mu$ M) con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 100 nM). Los resultados normalizados contra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se expresan como unidades luminométricas relativas (RLU) y como la media  $\pm$  SEM (n = 4;  $\square$  p<0.001 vs. basal,  $\square$  p<0.001 vs. AMPc,  $\square$  p<0.001 vs. AMPc+GATA-3, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.





**Figura 62. Los GC inhiben la actividad del promotor de IL-5 inducida por GATA-3 de manera dosis dependiente.** La línea celular EL-4 fue cotransfectada con 9  $\mu$ g del reportero del promotor de IL-5 clonado río arriba del gen de la luciferasa (IL-5-Luc) y 9  $\mu$ g del vector de expresión del receptor de glucocorticoides CMVhGR (GR), en presencia (+) o ausencia (-) de 9  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA3-GATA-3 (GATA-3). Luego de 16 hs en el medio de cultivo, las células fueron estimuladas durante 8 hs con (+) o sin (-) dexametasona (Dex, 0.1, 1, 10, 100 o 1000 nM). Cada valor es normalizado a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Los resultados son expresados como % de inhibición de la actividad del promotor de estimulado por GATA-3 (n = 4, B:  $\square$  p<0.001 vs. GATA-3 sin dexamethasone=0%, ANOVA en combinación con el test de Scheffé's). Se muestra uno de cuatro experimentos independientes con resultados similares.

## **V. DISCUSION**

---

---

## PARTE A

---

### V.1. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN T HELPER 1, T-BET

Los GC han sido utilizados durante los últimos sesenta años como terapia inmunosupresora para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. El rol antiinflamatorio e inmunosupresor de los GC se halla bien caracterizado y sería mediado fundamentalmente por la interacción entre el GR y miembros de las familias de FT como ser Rel A (NF- $\kappa$ B), AP-1, NFAT, STAT o CREB (Yang-Yen et al., 1990; Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995b; Auphan et al., 1997; De Bosscher et al., 2000; Adcock, 2001; De Bosscher et al., 2003) los cuales están involucrados en la activación de genes proinflamatorios e inmunoregulatorios como los genes que codifican para citoquinas, receptores de citoquinas, moléculas de adhesión y quemoquinas. Estos FT son pleiotrópicos y además no son específicos de linaje por lo cual resulta difícil la disección molecular de los efectos de los GC sobre distintos aspectos de las respuestas inmunes. Es por ello que en esta tesis nos enfocamos en el estudio de la interacción entre GC y los FT T-bet y GATA-3 que son selectivamente expresados por los linajes Th1 y Th2 y que median respuestas pro o antiinflamatorias respectivamente.

La capacidad de los GC de inhibir la inmunidad celular se halla ampliamente descripta pero el análisis a nivel mecanístico resulta insuficiente. En esta tesis describimos como los GC bloquean la función activadora de T-bet clave para la inmunidad celular orquestada por el linaje Th1. Se muestra que el GR interactúa con T-bet y bloquea su actividad transcripcional y su capacidad de unirse al DNA y activar la transcripción de genes involucrados en las respuestas inflamatorias (por ejemplo el gen de IFN- $\gamma$ ). Por lo tanto esta tesis contribuye a entender al menos una parte del mecanismo molecular implicado en las acciones inmunes y regulatorias de los GC sobre las respuestas Th1 y a futuro podría aportar información para el diseño de drogas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con un desbalance Th1/Th2.

Los GC median sus efectos mediante la unión a su receptor intracelular, el GR. Dicha unión gatilla su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo el GR activado por su ligando regula la transcripción de genes de manera positiva o negativa al unirse a GRE palindrómicos específicos o a nGRE respectivamente, sobre secuencias blanco regulatorias en el DNA. Los GC también son capaces de inhibir indirectamente la activación de genes por un mecanismo de transrepresión que involucra la interacción proteína-proteína, por ejemplo con miembros de la familia de FT como ser RelA o AP-1 (Jonat et al., 1990; Schule et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990; Caldenhoven et al., 1995; Scheinman et al., 1995a; Scheinman et al., 1995b; Gottlicher et al., 1998; De Bosscher et al., 2000; Nissen y Yamamoto, 2000; Reichardt et al., 2001; De Bosscher et al., 2003). Los ensayos de coimmunoprecipitación muestran que la transrepresión mediada por la interacción proteína-proteína es el mecanismo por el cual los GC también inhiben la actividad del FT T-bet. Como se demuestra en los experimentos de transfección usando como reporteros de la actividad del GR y de T-bet las construcciones TK-GRE2-Luc y T-bet-RE-Luc respectivamente, la asociación física entre el GR activado y T-bet resulta en la inhibición del potencial transactivador de ambos. A su vez, la acción de los GC es revertida por el antagonista sintético del GR, el RU38486, el cual actúa como competidor para la unión al GR, mostrando la especificidad de la acción del GR en nuestros experimentos. Además, los experimentos de EMSA revelan que los GC también son capaces de inhibir la unión de T-bet al DNA, lo cual podría ser consecuencia, al menos en parte, de la interacción física entre el GR y T-bet. Los experimentos de ChIP refuerzan este concepto y agregan que la asociación física también repercute en la inhibición del pegado de T-bet al DNA en el contexto del plegamiento de la cromatina y que por lo tanto también podría ocurrir *in vivo* en condiciones fisiológicas.

La naturaleza de la interacción entre el GR y T-bet aparentemente sería similar a la observada entre el GR y AP-1 o NF- $\kappa$ B, ya que en todos estos casos existe una represión mutua de la actividad transcripcional. El primer dedo de zinc del DBD del GR es esencial para la inhibición de la actividad transcripcional de AP-1 y de p65 mediada por transrepresión (Heck et al., 1994; Liden et al., 1997). Hallamos que el primer dedo de zinc del GR también resulta importante para la interacción física entre el GR y T-bet. La mutante S425G tiene una sustitución de una serina por una glicina en la posición 425, la cual remueve un grupo hidroxilo que supuestamente altera las uniones de hidrógeno entre el dominio dedo de zinc del GR y otras proteínas, por lo tanto sugiriendo que esta unión sería importante para la transrepresión mediada por la interacción proteína-proteína no solo de NF- $\kappa$ B, sino también de T-bet. Resulta

interesante que esta sustitución no solo altera la función del GR, sino también su interacción directa con T-bet.

Como fue mencionado con anterioridad, además de la hipótesis de la interacción proteína-proteína, existe otro mecanismo propuesto para la inhibición por GC de promotores mediante la unión del GR a nGRE (Sakai et al., 1988). Recientemente se encontró un nGRE en la posición -990 del promotor de *fasL*, el cual se superpone con los sitios de unión de NF- $\kappa$ B (Novac et al., 2006). El GR es capaz de inhibir el promotor de *fasL* por competencia con NF- $\kappa$ B por la unión al elemento de respuesta común. Sin embargo, no encontramos ninguna secuencia nGRE en el promotor de IFN- $\gamma$  y tampoco en el reportero T-bet-RE-Luc, por lo cual esta explicación sería poco probable para la inhibición de la actividad de T-bet sobre el promotor de IFN- $\gamma$  o directamente sobre sus elementos de respuesta. Sin embargo, la falta de elementos de respuesta bien conservados de este tipo dificulta la identificación de los nGRE (Novac et al., 2006). Por lo tanto, el mecanismo que se describe aquí no elimina por completo la posibilidad de que exista una combinación de nGRE y de la interacción vía proteína-proteína entre GR y T-bet como posibles mecanismos que juntos den cuenta de la inhibición global por GC del gen de IFN- $\gamma$ .

IFN- $\gamma$  es una citoquina inmunoregulatoria central responsable de varios efectos inmunológicos que hacen que su regulación sea clave para generar una adecuada inmunidad celular (Mosmann y Coffman, 1989; Young y Hardy, 1990; Abbas et al., 1996). Como se menciona con anterioridad, estudios en el gen de IFN- $\gamma$  muestran que T-bet juega un papel importante en la inducción de la transcripción y producción de esta citoquina (Szabo et al., 2000; Lighvani et al., 2001; Mullen et al., 2001; Afkarian et al., 2002; Neurath et al., 2002; Robinson y O'Garra, 2002; Szabo et al., 2002; Yin et al., 2002; Cho et al., 2003). Por ejemplo, la cotransfección de la línea celular EL-4, que no produce IFN- $\gamma$  con un vector de expresión de T-bet y el locus entero de IFN- $\gamma$  lleva a la producción de la citoquina IFN- $\gamma$  (Szabo et al., 2000). Es por ello que para estudiar la relevancia funcional del descubrimiento de la regulación inhibitoria de los GC sobre el FT T-bet utilizamos el promotor de IFN- $\gamma$ . Vemos que tanto en condiciones basales como activadas, los GC inhiben fuertemente la actividad de T-bet. Estos datos sugieren que la inhibición de T-bet por GC tiene un rol biológico importante en mediar la inhibición del gen de IFN- $\gamma$  y contribuiría a comprender la acción inmunosupresora de los GC en las respuestas inmunes celulares mediadas por el linaje Th1.

Recientemente se ha descrito como mecanismo para la acción regulatoria de T-bet la interacción proteína-proteína en otros dos sistemas. T-bet no solo puede actuar como un activador de la expresión del gen de IFN- $\gamma$  a través de su interacción directa con el promotor (Cho et al., 2003), sino que T-bet puede también interactuar con GATA-3, inhibiendo la expresión de citoquinas Th2 (Hwang et al., 2005b) y con RelA (NF- $\kappa$ B), regulando la unión de Rel A al promotor de IL-2, por lo tanto reprimiendo la producción de IL-2 (Hwang et al., 2005a). Para descartar la posibilidad de que la inhibición de la actividad transcripcional de T-bet este mediada por competición entre el GR y T-bet por el FT NF- $\kappa$ B, transfectamos las células EL-4 con un vector de expresión que codifica para la proteína dominante negativa de I kappa B (Traenckner et al., 1995) y confirmamos la inhibición mediada por GC de la actividad transcripcional de T-bet sin que exista interferencia de NF- $\kappa$ B, demostrando que NF- $\kappa$ B no tiene un rol en la inhibición de la actividad transcripcional de T-bet mediada por GC.

Si bien existe una fuerte regulación a nivel transcripcional de T-bet, a este nivel regulatorio se le agrega un efecto inhibitorio de los GC a nivel de la expresión del RNAm de T-bet. Al respecto, los ensayos de Northern Blot en cultivos primarios de esplenocitos de ratón muestran que los GC inhiben la expresión del RNAm de T-bet independientemente del tiempo, dosis y tipo de GC utilizado. Con el objetivo de analizar si el efecto inhibitorio de los GC es directo, no mediado por inhibición de la producción de las citoquinas Th1 como IL-12, que a su vez podrían inducir la expresión de T-bet, se agrega GC un tiempo lo suficientemente corto (1 h) para impedir el bloqueo de la producción de dichas citoquinas. Aún en éstas condiciones experimentales se ve que los GC inhiben la expresión de T-bet corroborando que el efecto es directo. El agregado de un inhibidor de la transcripción, actinomicina D muestra que el efecto es directo sobre la transcripción y no se debería a un efecto de inducción de la degradación del RNAm por GC. El efecto temprano de los GC también sugiere que el mecanismo de acción molecular implicado en dicha inhibición no involucraría la transactivación o síntesis proteica pero probablemente implique un mecanismo de transrepresión. Por lo tanto el efecto inhibitorio podría deberse a la transrepresión FT como STAT-1 que podrían actuar induciendo la expresión de T-bet (Lighvani et al., 2001; Afkarian et al., 2002). Otro posible mecanismo podría involucrar efectos no genómicos del GR (Buttgereit y Scheffold, 2002).

El tratamiento con Dex de los cultivos celulares causa una disminución importante no solo del RNAm sino también de la expresión proteica de T-bet. El agregado del antagonista del GR, RU38486, muestra que el efecto es mediado específicamente por el GR. Los ensayos de

Western Blot fueron realizados también en cultivos purificados y en condiciones diferenciadoras Th1 confirmando que la inhibición de la expresión proteica es directa sobre los linfocitos T (datos no mostrados). Para excluir los efectos de los GC sobre la expresión del RNAm y la proteína de T-bet, los experimentos de transfección fueron llevados a cabo por sobreexpresión de T-bet, lo cual permite que las construcciones reporteras sean exclusivamente dependientes de la actividad de T-bet (o de GR). Además, esto se constata mediante los experimentos de Western Blot en la línea EL-4 cotransfectada con los vectores de expresión de T-bet y GR bajo el mismo promotor (pcDNA3) confirmando que los GC no inhiben la expresión proteica de T-bet y que los efectos sobre la actividad transcripcional se deben exclusivamente a una inhibición de dicha actividad. De este modo la función biológica de los GC sobre la actividad de T-bet podría llevarse a cabo mediante el sinergismo entre la fuerte inhibición de la actividad transcripcional y de la expresión de T-bet asegurándose el apagado total de la respuesta inflamatoria.

A pesar que se sabe que los GC inhiben la producción de la mayoría de las citoquinas en las células T activadas, el efecto de los GC sobre la producción de citoquinas Th2 como IL-4 resulta controversial. En algunos casos se ha observado que los GC son capaces de inhibir la producción de IL-4 e IL-5 (Wang et al., 1993; Mori et al., 1997b; Chen et al., 2000c). Otros trabajos muestran que el tratamiento con GC *in vivo* e *in vitro* aumentan la producción de citoquinas Th2 específicas como IL-4, IL-5 e IL-10 al mismo tiempo que inhiben la producción de citoquinas Th1 como IL-12 (Bertoglio y Leroux, 1988; Daynes y Araneo, 1989; Brinkmann y Kristofic, 1995; Blotta et al., 1997; Dozmorov y Miller, 1998; Ramirez, 1998; Visser et al., 1998; Miyaura y Iwata, 2002). Estos resultados aparentemente contradictorios se deberían en parte a un abordaje experimental erróneo ya que en ellos no se diferencia el efecto sobre las células T y sobre las CPA. Al respecto se ha demostrado que el tratamiento con GC de monocitos y macrófagos inhibe la producción de IL-12. IL-12 es una citoquina extremadamente importante para la diferenciación del linaje Th1 y desarrollo de respuestas inmunes mediadas por células y es capaz de aumentar la síntesis en células T de IFN- $\gamma$  e inhibir la síntesis de IL-4, claves en la diferenciación Th1 y Th2 respectivamente. La disminución en la producción por CPA de IL-12 resulta en una disminución de la producción de IFN- $\gamma$  y un aumento de IL-4 en células T, favoreciendo de este modo la diferenciación al linaje Th2 y contribuyendo a su rol antiinflamatorio (Blotta et al., 1997). Estas citoquinas a su vez repercutirían en la activación de los FT involucrados en el desarrollo de su propio linaje y

directa o indirectamente al apagado del desarrollo del linaje opuesto como fue descrito con anterioridad. Además de inhibir la secreción de IL-12 en monocitos, los GC son capaces de inhibir la señalización de IL-12 en células T al inhibir la expresión de la cadena beta 2 del receptor de IL-12 y la fosforilación de STAT-4 (Franchimont et al., 2000), probablemente inhibiendo en parte la inducción de T-bet. Al respecto, los ensayos de Northern Blot que se muestran en esta tesis sugieren que si bien los GC inhiben la expresión de T-bet en cultivos primarios de esplenocitos de ratón, el agregado exógeno de IL-12, no solo es capaz de inducir la expresión de T-bet, sino que también revierte el efecto inhibitorio de los GC sobre la expresión de este FT. El mismo efecto se observa en los linfocitos T purificados lo que sugiere que el efecto es directo sobre las células T (datos no mostrados). Además, el hecho que IFN- $\gamma$  a pesar de inducir la expresión de T-bet es incapaz de revertir el efecto inhibitorio de los GC, marca que la reversión es específica de IL-12 y esto probablemente se deba a las cascadas de señalización que disparan cada una de estas citoquinas. Es interesante destacar que el efecto de IL-12 solo se manifiesta a nivel de la expresión de T-bet ya que no se observa ningún efecto de la citoquina en la inducción de la actividad transcripcional de T-bet, ni es capaz de revertir el efecto inhibitorio de los GC sobre dicha actividad (datos no mostrados). Estos datos sugieren que en el contexto de una respuesta inmune donde no solamente se liberan GC sino también citoquinas, y donde se activan una variedad de células inmunes, la activación de una respuesta inmune adecuada será el resultado de las señales que emanen tanto del TCR y moléculas accesorias como así también de los receptores para citoquinas y receptores solubles y/o de membrana y por lo tanto dependerá de ese contexto y su interacción con las cascadas de activación/inhibición de FT involucrados en orquestar una respuesta inmune. En este contexto los GC suprimen fuertemente la actividad de T-bet tanto a nivel de la expresión como de su actividad transcripcional asegurándose un efecto primario antiinflamatorio. Ahora bien, dependiendo del contexto de citoquinas disparadas por el antígeno, la activación mediada por citoquinas podría hacer que T-bet independientemente de la presencia inicial de GC, se active y se desarrolle una respuesta Th1.

T-bet fue primero descrito como un FT responsable de la diferenciación de células Th nativas en el linaje Th1 (Szabo et al., 2000) y tiene un rol crítico en mantener la función efectora Th1. Ratones deficientes en T-bet demuestran una inapropiada diferenciación Th1 y producción de IFN- $\gamma$  y desarrollan un síndrome tipo asmático Th2 con hiper respuesta aérea y demuestran mayor susceptibilidad a los modelos experimentales de asma (Finotto et al., 2002). Además las



respuestas Th1 están asociadas a síndromes autoinmunes y existiría un rol patogénico de T-bet en varias enfermedades autoinmunes caracterizadas por respuestas autoagresivas tipo 1 por ejemplo en artritis inflamatoria, diabetes tipo 1, enfermedad inflamatoria de Bowel, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico (Peng, 2006). Por lo tanto, el estudio de la regulación de T-bet por GC (que como mencionamos con anterioridad es utilizado en la clínica para el tratamiento de varias de estas afecciones) y su interacción con citoquinas inmunes podría aportar datos interesantes para el tratamiento de las enfermedades asociadas con este FT.

El diseño de drogas está dirigido actualmente a modular selectivamente los blancos proinflamatorios como AP-1 y NF- $\kappa$ B y también se enfocan en disminuir los efectos secundarios asociados al tratamiento a largo plazo con GC. Además de sus efectos sobre AP-1, NF- $\kappa$ B y NFAT, los GC poseen una actividad específica sobre el linaje Th1 a través de su acción sobre la inhibición de la fosforilación de STAT-4 (Franchimont et al., 2000) y ahora también sabemos sobre T-bet río abajo de STAT-4. El conocimiento que T-bet es inhibido por GC por un mecanismo de transrepresión podría llegar a abrir nuevos caminos para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

---

## PARTE B

---

### V.2. CARACTERIZACIÓN DE LA REGULACIÓN POR GLUCOCORTICOIDES DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN T HELPER 2, GATA-3

Como se detalla en la introducción (Fig. 12), la regulación de la transcripción por el GR es llevada a cabo por una serie de diversos mecanismos. Inicialmente se demostró que el GR mediaba la activación transcripcional del gen MMTV por unión como dímero a un elemento de respuesta consenso, el GRE (Zaret y Yamamoto, 1984). Sin embargo, con el tiempo la cantidad de mecanismos utilizados por el GR para controlar la expresión de genes se ha expandido y en particular, han emergido muchos detalles acerca de la represión transcripcional mediada por el GR. Estos mecanismos involucran la unión al DNA, la presencia de nGRE, el reclutamiento de coactivadores o corepresores, la habilidad de secuestrar proteínas (transrepresión) y la regulación de la actividad de quinasas. Actualmente está claro que algunos de estos sistemas operan en conjunto, impartiendo variabilidad y complejidad con respecto a la regulación transcripcional de un promotor blanco.

En esta parte de la tesis describimos la acción inhibitoria de los GC sobre la actividad de GATA-3 y utilizamos como herramienta para el análisis funcional de dicha regulación al promotor de IL-5. Demostramos que los GC inhiben la expresión del RNAm y proteína y la actividad transcripcional de GATA-3. A su vez, a diferencia de lo que ocurre en la modulación por GC de la actividad de T-bet, vemos que la inhibición de la actividad de GATA-3 no se debería a una interacción proteína-proteína entre el GR y GATA-3. Más bien, parecería haber un importante efecto inhibitorio de los GC a nivel de la fosforilación de este FT que repercutiría en su actividad transcripcional. Estos hallazgos podrían contribuir a comprender el mecanismo molecular intrínseco involucrado en la regulación del linaje Th2 mediado por GC y a futuro podría aportar información para el diseño de drogas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con un desbalance Th1/Th2.

Al igual que el efecto sobre la expresión de T-bet, los ensayos de Northern Blot en cultivos primarios de esplenocitos de ratón muestran que GC inhiben directamente la expresión de GATA-3 a tiempos largos y tiempos cortos descartando un efecto indirecto a través de la

inhibición de la producción de citoquinas Th2. Los ensayos con actinomicina D muestran que dicha inhibición no se debería a un aumento de la degradación del mensajero sino más bien a un efecto directo sobre la expresión de GATA-3. Además el efecto inhibitorio observado a tiempos cortos podría deberse a la transrepresión de FT como NF- $\kappa$ B que podrían actuar induciendo la expresión de GATA-3 (Das et al., 2001). Otro posible mecanismo podría involucrar efectos no genómicos del GR (Buttgereit y Scheffold, 2002).

El efecto inhibitorio también sería independiente del tipo y dosis de GC utilizado. Además, al igual que para T-bet, los GC son capaces de inhibir la expresión proteica de GATA-3 tanto en cultivos primarios mixtos, purificados o cultivos diferenciados (datos no mostrados), mostrando que el efecto se ejerce directamente sobre las células T. El agregado del antagonista sintético RU38486 confirma que el efecto es mediado por el GR.

Las citoquinas Th2 IL-4 e IL-5 son producida casi exclusivamente por los linfocitos Th2 y algunas células Th0. La señalización vía IL-4 induce la expresión de altos niveles de GATA-3 que bloquea la señalización vía IL-12 al inhibir la expresión de la cadena beta 2 del receptor de IL-12. A su vez, GATA-3 induce la expresión de IL-4 e IL-5 y consecuentemente respuestas humorales y antiinflamatorias. Como ya se mencionó con anterioridad, el efecto de los GC sobre la producción de éstas citoquinas, resulta controversial ya que algunos trabajos muestran que los GC inhiben la producción de IL-4 e IL-5 mientras que otros muestran que aumentan la producción de citoquinas Th2. Por lo tanto el análisis del efecto de los GC sobre los linajes Th a partir de la medición de la producción de citoquinas por células T resultaría de escasa exactitud. Es por ello que resulta más específico y directo el estudio del efecto de los GC sobre FT linaje específicos como GATA-3. Al respecto, los ensayos de Northern Blot expuestos en esta tesis muestran que si bien los GC inhiben la expresión de GATA-3, el agregado de IL-4 revierte el efecto inhibitorio. Al igual que el efecto observado para T-bet en relación a IL-12, el efecto de IL-4 solo se manifiesta a nivel de la expresión de GATA-3 ya que no es capaz de revertir el efecto inhibitorio de los GC ejercido a nivel transcripcional (datos no mostrados). La inhibición también se observa en linfocitos T purificados lo que sugiere que el efecto es directo sobre las células T. Teniendo estos resultados en mente, a pesar de haberse reportado que el tratamiento con GC aumenta la expresión de citoquinas Th2 sugiriendo un shift hacia este tipo de respuestas, este aumento no sería consecuencia de una inducción de la expresión del RNAm de GATA-3, más bien los GC inhiben tanto la expresión del mensajero de GATA-3 y de T-bet y la modulación diferencial estaría dada a otro nivel como se discutirá más adelante. Tanto T-

bet como GATA-3 serían inhibidos en un primer momento por los GC y el entorno de citoquinas liberadas en el curso de una respuesta inmune podría ser capaz de crear un desbalance en la expresión de estos FT, ayudando a producir el viraje hacia un fenotipo adecuado para eliminar al patógeno.

El análisis del efecto de los GC sobre la actividad transcripcional de GATA-3 se realiza utilizando como reportero de dicha actividad, los elementos de respuesta de GATA-3 clonados río arriba del gen de la luciferasa (GATA-RE-Luc). Estos experimentos muestran que los GC inhiben la actividad transcripcional de GATA-3 de manera dosis dependiente y que la inhibición es revertida por el antagonista del receptor RU38486 demostrando la especificidad de dicha inhibición. El hecho que esta secuencia mínima no posea GRE o nGRE, junto con la falta de interacción proteína-proteína del GR con GATA-3 y la ausencia de inhibición por GC de la unión de GATA-3 a sus sitios de pegado en el DNA, sugiere que el GR podría interactuar con otros FT involucrados en el complejo transcripcional de GATA-3.

Un mecanismo adicional de acción inhibitoria de los GC implica la inhibición de la actividad de quinasas. Por ejemplo, se ha demostrado que la inhibición de la señalización vía JNK representa un nuevo mecanismo por el cual el GR antagoniza con AP-1 (Caelles et al., 1997). Teniendo esto en mente y dado que el efecto inhibitorio de los GC sobre la actividad de GATA-3 en condiciones basales es reducida y teniendo en cuenta además que AMPc aumenta la expresión de IL-5 probablemente a través de la fosforilación de GATA-3 vía p38 MAPK (Chen et al., 2000a), decidimos estudiar el efecto de los GC en condiciones de activación utilizando AMPc. Los ensayos de transfección muestran que AMPc potencia la actividad de GATA-3 sobre sus elementos de respuesta y además que los GC bloquean fuertemente este efecto. Para poder dilucidar el mecanismo intrínseco implicado decidimos estudiar la vía de señalización activada por AMPc. Los ensayos de transfección y de Western Blot en presencia del inhibidor de la PKA H89 y el inhibidor de p38 MAPK SB203580 muestran que en nuestro modelo AMPc activa PKA y ésta activa p38 MAPK. A su vez p38 MAPK aumenta la actividad de GATA-3 sobre sus elementos de respuesta y esta actividad es fuertemente inhibida por GC. Como los GC no son capaces de inhibir la fosforilación de p38 inducida por AMPc nos preguntamos si los GC podrían inhibir la fosforilación de GATA-3. Efectivamente los ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra residuos de fosfo-treonina y revelando con anticuerpos anti-GATA-3 en presencia de Dex muestran que los GC inhiben la fosforilación de GATA-3. Quedan abiertos ensayos adicionales para terminar de dilucidar el

mecanismo de inhibición por GC de la actividad de GATA-3 inducida por AMPc. Uno implicaría demostrar mediante un ensayo de quinasas *in vitro*, utilizando la forma recombinante activa de p38 MAPK y GATA-3 recombinante que p38 MAPK directamente fosforila a GATA-3. Otro estudio complementario podría ser un ensayo de quinasas para p38 MAPK para ver si los GC están inhibiendo la actividad de p38 a pesar de no inhibir la fosforilación de dicha quinasa.

Es poco probable que la fosforilación afecte la capacidad de GATA-3 de unirse al DNA dado que la proteína GATA-3 recuperada de células Th2 sin estimular o GATA-3 obtenida por transcripción *in vitro*, es capaz de unirse a sus sitios en el promotor de IL-5 con alta afinidad (Chen et al., 2000a). En cambio la fosforilación de GATA-3 podría ser importante para su habilidad para interactuar con otros factores regulatorios para promover la expresión del gen de IL-5 o para hacer más accesible el locus IL-4/IL-13 a otros factores. Nuestros experimentos muestran que el camino de señalización AMPc/PKA/p38 MAPK juega un rol importante en la activación de GATA-3. La potente inhibición por GC de esta vía podría contribuir al apagado final de las respuestas Th2 de acuerdo con el rol inmunosupresor de los GC. Además, el conocimiento de estas vías y su importancia en la regulación de la actividad de GATA-3 podría servir como futuros blancos terapéuticos de enfermedades relacionadas con la expresión de GATA-3.

Recientemente se demostró que la inhibición de la actividad transcripcional mediada por GC del promotor de IL-5 es un proceso activo en el sentido que la co-expresión de una histona deacetilasa (HDAC) aumenta la actividad inhibitoria del GR mientras que el agregado de TSA (un inhibidor de HDAC) revierte parcialmente dicha inhibición. Además se demostró que el GR interacciona con HDAC1 (Jee et al., 2005). Por tal motivo el reclutamiento del GR podría alterar la habilidad de GATA-3 ya sea de unirse a sus sitios blancos, causar una inducción transcripcional o mantener un contexto permisivo para la transcripción. Actualmente estamos investigando estas posibilidades mediante CHIP. Estas actividades presentan una paradoja interesante: que es lo que le pasa al GR para permitir el reclutamiento de co-activadores luego de la unión a su ligando en algunas circunstancias y co-represores en otras?.

El tratamiento sistémico con GC causa inmunosupresión general y también varios efectos secundarios. Estos efectos pueden ser reducidos con un tratamiento local (en el caso del asma por inhalación) pero la supresión de la inflamación aérea sería solamente temporaria. Por lo

tanto se necesitan aproximaciones selectivas para bloquear la activación de células Th2. Si se puede lograr la inhibición selectiva de la activación de células Th2, se reduciría la secreción de citoquinas Th2 sin comprometer la función de las células Th1. Al bloquear la secreción de citoquinas no solamente se reducirá el efecto en los tejidos blanco sino que el entorno de citoquinas se puede alterar y por lo tanto se reduciría la generación de nuevas células Th2. En este sentido, GATA-3 es específico de células T y es el único factor Th2 específico que tiene el potencial para inhibir la producción de todas las citoquinas claves Th2. El bloqueo de GATA-3 podría por lo tanto inhibir la secreción de citoquinas Th2 y también bloquear la generación de nuevas células Th2.

Si nuestro objetivo final es la reducción a tiempos largos en el número y actividad de células Th2 entonces hay que enfocarse en nuevos modos de terapias para el asma. Una aproximación podría ser aumentar la población de células Th1 activadas en los sitios de inflamación que podrían suprimir los efectos de las citoquinas Th2. Hacer blanco sobre FT Th2 específicos como GATA-3 utilizando aproximaciones farmacológicas (por ejemplo con análogos de GC que selectivamente posean alguna de sus actividades) o antisentido podría inhibir respuestas Th2 dejando intactas las células Th1 y evitando una inmunosupresión generalizada. Con el tiempo sería posible que estos efectos se sostengan ya que existe evidencia que la estimulación durante tiempos largos con citoquinas Th1 podría inducir un shift desde una población predominante Th2 hacia una Th1. Estas aproximaciones inmunomodulatorias tienen el potencial de alterar el sistema de defensa inmune altamente regulado en el tracto respiratorio incluyendo efectos Th1 no deseados como enfermedades autoinmunes, reacciones de hipersensibilidad retardada y inflamación excesiva. El valor potencial de la inmunomodulación en el control del asma demanda estudios más detallados acerca de la modulación de los FT Th1/Th2 implicados.

---

## PARTE C

---

### V.3. INHIBICIÓN DIFERENCIAL T-BET/GATA-3. IMPLICANCIA FARMACOLÓGICA/CONCLUSIONES

Debido a sus efectos inmunosupresores los GC son utilizados para tratar varias enfermedades autoinmunes incluyendo esclerosis múltiple, artritis reumatoidea y la enfermedad inflamatoria de Bowel. Los GC también son utilizados para el tratamiento standard de lupus eritematoso sistémico, sarcoidosis y asma. También son utilizados para reducir el rechazo a transplantes de órganos y para el tratamiento de edema cerebral, condiciones de shock, ciertos tipos de cancer de la sangre (linfomas B y T), así como también enfermedades que involucran insuficiencia de la corteza adrenal. Además pueden inhibir la migración de leucocitos a sitios inflamatorios y reducir los síntomas generales de inflamación. Los GC ejercen sus efectos a través de su unión con un receptor intracelular, el GR, el cual puede actuar como un FT nuclear. A nivel molecular y en células inmunes, los GC pueden inhibir la actividad de T-bet y GATA-3. Cuando se activa el receptor T y dependiendo del tipo de antígeno, del tipo de CPA, así como también del entorno de citoquinas y quemoquinas, las células Th nativas pueden diferenciarse hacia células Th1 que median las respuestas inmunes celulares contra patógenos intracelulares o hacia células Th2 que median respuestas de tipo humoral y mediada por eosinófilos/mastocitos. El sistema inmune debe mantenerse balanceado mediante un continuo shift entre los perfiles Th1 y Th2. En un individuo con un desorden autoinmune, uno domina y suprime al otro. Sorprendentemente, la mayoría de los desordenes autoinmunes por ejemplo artritis reumatoidea y esclerosis múltiple, muestran un perfil Th1, mientras que el asma y dermatitis atópica muestran un perfil Th2.

A pesar de la efectividad del tratamiento con GC de los desordenes inflamatorios, explicando su uso clínico de amplio alcance, existe una importante desventaja al tratamiento crónico con GC que implica la aparición de una amplia gama de efectos secundarios incluyendo diabetes, cataratas etc... Por lo tanto, la industria farmacológica todavía esta interesada en terapias alternativas como por ejemplo nuevos análogos selectivos de los GC que podrían ofrecer un menor perfil de efectos secundarios. En función de alcanzar esta meta el conocimiento

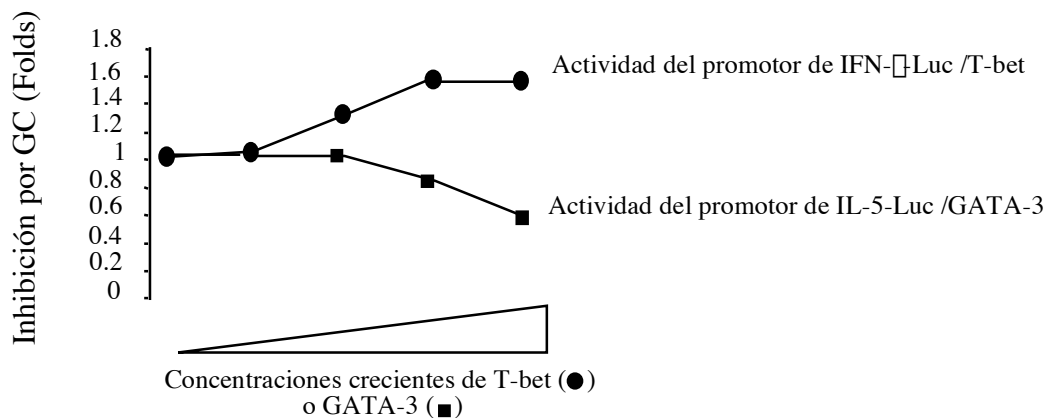
detallado de los mecanismos moleculares que subyacen al efecto antiinflamatorio de los GC es un prerrequisito.

En esta tesis demostramos que los GC inhiben fuertemente la actividad transcripcional de T-bet y también, pero en menor medida, la actividad de GATA-3 en experimentos de transfección utilizando como blancos de la actividad de T-bet y GATA-3 los promotores de IFN- $\gamma$  y de IL-5 respectivamente y también inhiben de manera diferencial la actividad sobre los elementos de respuesta de T-bet y GATA-3 clonados río arriba del gen de la luciferasa. Estudios de coimmunoprecipitación y utilizando mutantes de GR que no transactivan o no transreprimen, muestran que la transrepresión por interacción proteína-proteína entre el GR y T-bet sería el mecanismo molecular causante de la inhibición de la actividad transcripcional y de la inhibición de la unión de T-bet al DNA. Al contrario, los GC no interactúan directamente con GATA-3 ni afectan su pegado al DNA. Parecería ser que los GC inhiben la fosforilación de GATA-3 vía AMPc, PKA y p38 MAPK afectando su actividad transcripcional. Además vimos en cultivos primarios de esplenocitos de ratón, que los GC inhiben la expresión del RNAm y de la proteína de T-bet y de GATA-3 sin inducir su degradación. Por lo tanto, consistente con su efecto inmunosupresivo, los GC inhiben tanto la expresión como la actividad transcripcional de los factores claves para la diferenciación Th T-bet y GATA-3 pero mediante diferentes mecanismos moleculares que ayudarían a explicar el efecto diferencial de los GC sobre la diferenciación Th.

Si comparamos el efecto inhibitorio de los GC sobre la actividad de GATA-3 con el efecto inhibitorio sobre la actividad de T-bet (utilizando los reporteros GATA-3-RE-Luc y T-bet-RE-Luc respectivamente) en condiciones basales, éste último parece ser mucho más potente ( $33\pm 3\%$  vs  $53\pm 3\%$  de inhibición respectivamente). Por lo tanto, a pesar que los GC inhiben la actividad transcripcional de ambos, el efecto parece ser mayor sobre el FT Th1 específico, sugiriendo que una inhibición diferencial sobre la actividad de T-bet y GATA-3 podría ser un mecanismo por el cual los GC favorecen la diferenciación Th2. Si tenemos en cuenta la influencia que la inhibición regulatoria mutua Th1-Th2 (Hwang et al., 2005b) tendría en la subsiguiente diferenciación, una mayor sensibilidad de T-bet comparado con GATA-3 a la inhibición por GC, explicaría la inducción Th2 mediada por GC. Este efecto sobre la actividad de los FT repercutiría luego en la expresión de genes inmunes y producción de citoquinas amplificando la respuesta.

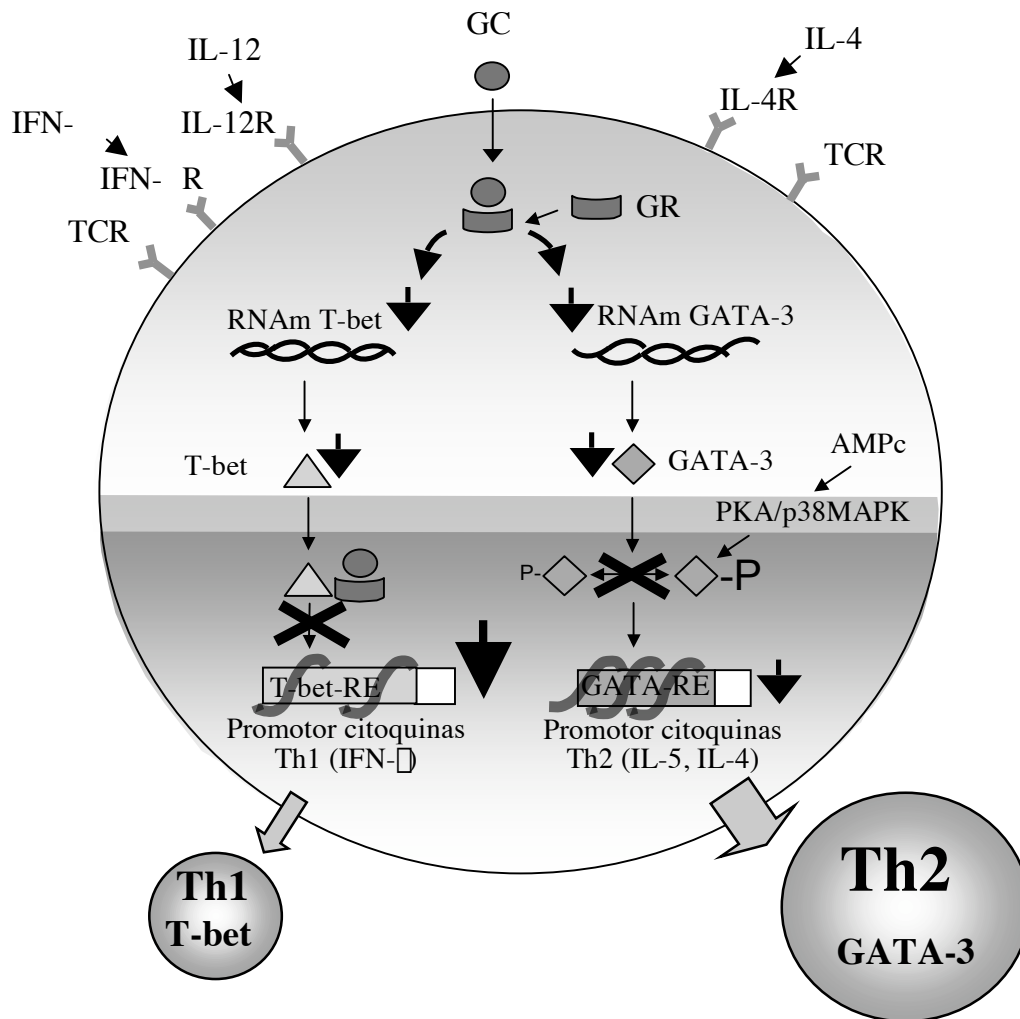


Para analizar además la consecuencia funcional de la acción inhibitoria de los GC en la actividad de GATA-3 y T-bet utilizamos el promotor de IL-5 y de IFN- $\gamma$  clonados río arriba del gen de la luciferasa respectivamente (Fig. 63). Observamos que cuanto mayor es la cantidad de GATA-3 transfectado en el sistema, menor es el porcentaje de inhibición mediado por GC. Al contrario, cuanto mayor es la cantidad de T-bet, mayor es la inhibición de su actividad transcripcional sobre el promotor de IFN- $\gamma$ . De este modo, parecería ser que T-bet es un FT mucho más sensible para la inhibición por GC sobre IFN- $\gamma$  que lo que es GATA-3 sobre el promotor de IL-5 reforzando la idea que una inhibición diferencial de la actividad de GATA-3 y T-bet podría ser el camino por el cual los GC favorecen la diferenciación del linaje Th2.



**Figura 63. Los GC inhiben de manera diferencial la actividad transcripcional bajo concentraciones crecientes de los vectores de expresión de T-bet y GATA-3.** Los datos graficados en esta figura se extrapolan en parte de los experimentos mostrados en las figuras 40 y 61.

Por lo tanto, consistentemente con su actividad inmunoregulatoria, los GC inhiben a los FT claves Th1 y Th2, pero favorecen el desarrollo Th2 al inhibir más uno que otro y por diferentes mecanismos (Fig. 64) lo cual podría ser más evidente en los tratamientos crónicos o a largo plazo (Daynes y Araneo, 1989; Brinkmann y Kristofic, 1995; Ramirez, 1998; Miyaura y Iwata, 2002). En cambio en un tratamiento agudo parecería que los GC inhiben a ambos tanto a nivel del RNAm como de proteína que, como ya fue discutido con anterioridad, estaría de acuerdo con un rol inmunosupresor generalizado de los GC por el cual los GC se asegurarían del apagado final de la respuesta inmune.



**Figura 64. Rol de los GC en el fenotipo del linfocito Th.** El tratamiento agudo con GC llevaría a la inhibición de los FT T-bet y GATA-3 probablemente a través de la inhibición de la expresión del RNAm y proteína de ambos. En cambio, el tratamiento crónico llevaría a una inhibición diferencial. Por un lado los GC inhibirían fuertemente la actividad transcripcional de T-bet por transrepresión. Sobre GATA-3 los GC inhibirían su actividad transcripcional, al menos en parte, debido a la inhibición de la fosforilación inducida por AMPc/PKA/p38 MAPK. La fosforilación de GATA-3 podría ser importante para interactuar con otros factores regulatorios para promover la expresión del gen de IL-5 o para hacer más accesible el locus IL-4/IL-13 a otros factores. En condiciones de activación los GC inhiben fuertemente la actividad transcripcional de ambos asegurándose el apagado final de la respuesta inmune. Las citoquinas modulan el balance entre ambos FT para desarrollar una respuesta inmune adecuada.

Teniendo en cuenta que a pesar de la efectividad del tratamiento con GC de los desórdenes inflamatorios que explican su difundido uso clínico, una importante desventaja del tratamiento

involucra la aparición de un amplio rango de efectos secundarios debilitadores como ser diabetes, cataratas, alteraciones musculares, etc, la industria farmacológica se encuentra sumamente interesada en el desarrollo de terapias alternativas con nuevos GC que posean actividades específicas, las cuales ofrecerían un mejor perfil de efectos secundarios. Con el objetivo de alcanzar esta meta, se necesita el conocimiento de los mecanismos moleculares subyacente de los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de los GC. Los resultados de esta tesis indican que tanto T-bet como GATA-3 podrían ser útiles como blancos para el tratamiento farmacológico de GC en las enfermedades inmunes. Siendo T-bet un FT específico y clave para el desarrollo del linaje Th1, entender la regulación de dicho FT podría ayudar a mejorar enfermedades mediadas por el fenotipo Th2 como ser asma, así como también enfermedades Th1 inflamatorias y autoinmunes (Boumpas et al., 1993). Del mismo modo, el estudio de la interacción entre GC y GATA-3, un FT clave para el desarrollo del linaje Th2, también ayudaría al tratamiento de enfermedades Th2 como el asma así como también otras enfermedades inmunes relacionadas con alteraciones en los fenotipos de los linfocitos Th y supresión de respuestas inflamatorias. Actualmente, se encuentran en desarrollo GC llamados “disociativos” que favorecerían los mecanismos de transrepresión y reducirían el riesgo de efectos secundarios sistémicos (De Bosscher et al., 2003). Además, el bloqueo de los caminos de señalización de citoquinas se han vuelto importantes para el desarrollo nuevos agentes inmunosupresores (O'Shea et al., 2005).

La inmunopatogénesis de las enfermedades autoinmunes no encuadra del todo en la dicotomía Th1/Th2. Las células T CD4<sup>+</sup> también pueden diferenciarse en células que producen las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- $\beta$ , llamadas células Th3 y pueden convertirse en células T regulatorias “adaptativas”. Ambos tipos celulares parecen proteger contra la autoinmunidad. Estudios en encefalitis autoinmune experimental y artritis inducida por adyuvantes muestran la importancia de otro subset Th que produce IL-17 y es conocido como células Th17. A pesar que esta población celular ha sido implicada en la exacerbación de patologías autoinmunes, el rol de las células Th17 en la defensa del huésped aún debe ser dilucidada (Tato et al., 2006). Considerando estos nuevos fenotipos de linfocitos Th que también participarían en la regulación del delicado balance implicado en una respuesta inmune como los linfocitos Th17, la existencia de FT específicos de estos linajes, como T-bet que fue recientemente descrito (Gocke et al., 2007) también podrían ser blancos moleculares interesantes para estudiar el rol de los GC en el sistema inmune y su posible uso terapéutico.

La ganancia de conocimiento que surja a partir de nuevos estudios ayudaría al desarrollo de una estrategia enfocada a combatir enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

## **VI. REFERENCIAS**

---

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* *383*, 787-793.
- Adcock, I. M. (2001). Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther* *14*, 211-219.
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol* *3*, 549-557.
- Agarwal, S., and Rao, A. (1998). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* *9*, 765-775.
- Aittomaki, S., Pesu, M., Groner, B., Janne, O. A., Palvimo, J. J., and Silvennoinen, O. (2000). Cooperation among Stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity Fc gamma receptor I in monocytes. *J Immunol* *164*, 5689-5697.
- Akiba, H., Miyahira, Y., Atsuta, M., Takeda, K., Nohara, C., Futagawa, T., Matsuda, H., Aoki, T., Yagita, H., and Okumura, K. (2000). Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. *J Exp Med* *191*, 375-380.
- Almlof, T., Wright, A. P., and Gustafsson, J. A. (1995). Role of acidic and phosphorylated residues in gene activation by the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* *270*, 17535-17540.
- Ansel, K. M., Lee, D. U., and Rao, A. (2003). An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* *4*, 616-623.
- Armant, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (1995). IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression. *Immunology* *85*, 331-337.
- Arthur, R. P., and Mason, D. (1986). T cells that help B cell responses to soluble antigen are distinguishable from those producing interleukin 2 on mitogenic or allogeneic stimulation. *J Exp Med* *163*, 774-786.

- 
- Arzt, E., Stelzer, G., Renner, U., Lange, M., Muller, O. A., and Stalla, G. K. (1992). Interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in human corticotrophic adenoma and murine pituitary cell cultures. *J Clin Invest* 90, 1944-1951.
- Arzt, E., Sauer, J., Pollmacher, T., Labeur, M., Holsboer, F., Reul, J. M., and Stalla, G. K. (1994). Glucocorticoids suppress interleukin-1 receptor antagonist synthesis following induction by endotoxin. *Endocrinology* 134, 672-677.
- Ashkar, S., Weber, G. F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M. E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Glimcher, M. J., and Cantor, H. (2000). Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287, 860-864.
- Ashwell, J. D., Lu, F. W., and Vacchio, M. S. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 18, 309-345.
- Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270, 286-290.
- Auphan, N., DiDonato, J. A., Helmborg, A., Rosette, C., and Karin, M. (1997). Immunoregulatory genes and immunosuppression by glucocorticoids. *Arch Toxicol Suppl* 19, 87-95.
- Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (1998). Transcription factors and asthma. *Eur Respir J* 12, 221-234.
- Beato, M., Chalepakis, G., Schauer, M., and Slater, E. P. (1989). DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 32, 737-747.
- Bertoglio, J. H., and Leroux, E. (1988). Differential effects of glucocorticoids on the proliferation of a murine helper and a cytolytic T cell clone in response to IL-2 and IL-4. *J Immunol* 141, 1191-1196.

- 
- Besedovsky, H., Sorkin, E., Keller, M., and Muller, J. (1975). Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc Soc Exp Biol Med* 150, 466-470.
- Besedovsky, H., and Sorkin, E. (1977). Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 27, 1-12.
- Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., and Dinarello, C. A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233, 652-654.
- Besedovsky, H. O., and del Rey, A. (1992). Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. *Front Neuroendocrinol* 13, 61-94.
- Betz, M., and Fox, B. S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 146, 108-113.
- Bianchi, M., Meng, C., and Ivashkiv, L. B. (2000). Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9573-9578.
- Biola, A., Andreau, K., David, M., Sturm, M., Haake, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2000). The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes. *FEBS Lett* 487, 229-233.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blotta, M. H., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (1997). Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 158, 5589-5595.
- Boumpas, D. T., Anastassiou, E. D., Older, S. A., Tsokos, G. C., Nelson, D. L., and Balow, J. E. (1991). Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression in vitro at the level of nuclear transcription. *J Clin Invest* 87, 1739-1747.



- Boumpas, D. T., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., Cupps, T. R., and Balow, J. E. (1993). Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* *119*, 1198-1208.
- Boyum, A. (1968). Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* *97*, 7.
- Braun, C. M., Huang, S. K., Bashian, G. G., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L. M., and Essayan, D. M. (1997). Corticosteroid modulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses. *J Allergy Clin Immunol* *100*, 400-407.
- Brinkmann, V., and Kristofic, C. (1995). Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets. *J Immunol* *155*, 3322-3328.
- Brown, E. A., Dare, H. A., Marsh, C. B., and Wewers, M. D. (1996). The combination of endotoxin and dexamethasone induces type II interleukin 1 receptor (IL-1r II) in monocytes: a comparison to interleukin 1 beta (IL-1 beta) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra). *Cytokine* *8*, 828-836.
- Brown, M. A., and Hural, J. (1997). Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol* *17*, 1-32.
- Buttgereit, F., and Scheffold, A. (2002). Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* *67*, 529-534.
- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J. M., and Munoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* *11*, 3351-3364.
- Caldenhoven, E., Liden, J., Wissink, S., Van de Stolpe, A., Raaijmakers, J., Koenderman, L., Okret, S., Gustafsson, J. A., and Van der Saag, P. T. (1995). Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* *9*, 401-412.

- Chen, C. H., Zhang, D. H., LaPorte, J. M., and Ray, A. (2000a). Cyclic AMP activates p38 mitogen-activated protein kinase in Th2 cells: phosphorylation of GATA-3 and stimulation of Th2 cytokine gene expression. *J Immunol* *165*, 5597-5605.
- Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P. E., Coombes, R. C., Egly, J. M., and Ali, S. (2000b). Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol Cell* *6*, 127-137.
- Chen, R., Burke, T. F., Cumberland, J. E., Brummet, M., Beck, L. A., Casolaro, V., and Georas, S. N. (2000c). Glucocorticoids inhibit calcium- and calcineurin-dependent activation of the human IL-4 promoter. *J Immunol* *164*, 825-832.
- Cho, J. Y., Grigura, V., Murphy, T. L., and Murphy, K. (2003). Identification of cooperative monomeric Brachyury sites conferring T-bet responsiveness to the proximal IFN-gamma promoter. *Int Immunol* *15*, 1149-1160.
- Chuvpilo, S., Schomberg, C., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F., and Serfling, E. (1993). Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res* *21*, 5694-5704.
- Cippitelli, M., Sica, A., Viggiano, V., Ye, J., Ghosh, P., Birrer, M. J., and Young, H. A. (1995). Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. *J Biol Chem* *270*, 12548-12556.
- Coffman, R. L., and Reiner, S. L. (1999). Instruction, selection, or tampering with the odds? *Science* *284*, 1283, 1285.
- Constant, S. L., and Bottomly, K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* *15*, 297-322.
- Costas, M., Trapp, T., Pereda, M. P., Sauer, J., Rupprecht, R., Nahmod, V. E., Reul, J. M., Holsboer, F., and Arzt, E. (1996). Molecular and functional evidence for in vitro cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. TNF-alpha

---

priming increases glucocorticoid inhibition of TNF-alpha-induced cytotoxicity/apoptosis. *J Clin Invest* 98, 1409-1416.

Costas, M. A., Muller Igaz, L., Holsboer, F., and Arzt, E. (2000). Transrepression of NF-kappaB is not required for glucocorticoid-mediated protection of TNF-alpha-induced apoptosis on fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1499, 122-129.

Cupps, T. R., and Fauci, A. S. (1982). Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol Rev* 65, 133-155.

Dancescu, M., Rubio-Trujillo, M., Biron, G., Bron, D., Delespesse, G., and Sarfati, M. (1992). Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Exp Med* 176, 1319-1326.

Das, J., Chen, C. H., Yang, L., Cohn, L., Ray, P., and Ray, A. (2001). A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol* 2, 45-50.

Davies, T. H., Ning, Y. M., and Sanchez, E. R. (2002). A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem* 277, 4597-4600.

Daynes, R. A., and Araneo, B. A. (1989). Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *Eur J Immunol* 19, 2319-2325.

De Boer, M. L., Mordvinov, V. A., Thomas, M. A., and Sanderson, C. J. (1999). Role of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in the expression of interleukin-5 and other cytokines involved in the regulation of hemopoetic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1221-1236.

De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2000). Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J Neuroimmunol* 109, 16-22.

- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24, 488-522.
- DeFranco, D. B., and Guerrero, J. (2000). Nuclear matrix targeting of steroid receptors: specific signal sequences and acceptor proteins. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10, 39-44.
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276, 589-592.
- Deroo, B. J., and Archer, T. K. (2001). Glucocorticoid receptor activation of the I kappa B alpha promoter within chromatin. *Mol Biol Cell* 12, 3365-3374.
- Dinarello, C. A. (1994). The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J* 8, 1314-1325.
- Distelhorst, C. W. (2002). Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 6-19.
- Dittmar, K. D., and Pratt, W. B. (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem* 272, 13047-13054.
- Dostert, A., and Heinzl, T. (2002). DNA-dependent cofactor selectivity of the glucocorticoid receptor. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 279-295.
- Dozmorov, I. M., and Miller, R. A. (1998). Generation of antigen-specific Th2 cells from unprimed mice in vitro: effects of dexamethasone and anti-IL-10 antibody. *J Immunol* 160, 2700-2705.
- Drouin, J., Maira, M., and Philips, A. (1998). Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and

---

glucocorticoid repression of POMC gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 59-63.

Elloso, M. M., and Scott, P. (2001). Differential requirement of CD28 for IL-12 receptor expression and function in CD4(+) and CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 31, 384-395.

Fahey, A. J., Robins, R. A., Kindle, K. B., Heery, D. M., and Constantinescu, C. S. (2006). Effects of glucocorticoids on STAT4 activation in human T cells are stimulus-dependent. *J Leukoc Biol* 80, 133-144.

Ferber, I. A., Lee, H. J., Zonin, F., Heath, V., Mui, A., Arai, N., and O'Garra, A. (1999). GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. *Clin Immunol* 91, 134-144.

Finkelman, F. D., Morris, S. C., Orekhova, T., Mori, M., Donaldson, D., Reiner, S. L., Reilly, N. L., Schopf, L., and Urban, J. F., Jr. (2000). Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 164, 2303-2310.

Finotto, S., Neurath, M. F., Glickman, J. N., Qin, S., Lehr, H. A., Green, F. H., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P. R., Szabo, S. J., *et al.* (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295, 336-338.

Fox, H. S., Bond, B. L., and Parslow, T. G. (1991). Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol* 146, 4362-4367.

Franchimont, D., Louis, E., Dewe, W., Martens, H., Vrindts-Gevaert, Y., De Groote, D., Belaiche, J., and Geenen, V. (1998). Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures. *Regul Pept* 73, 59-65.

Franchimont, D., Galon, J., Gadina, M., Visconti, R., Zhou, Y., Aringer, M., Frucht, D. M., Chrousos, G. P., and O'Shea, J. J. (2000). Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol* 164, 1768-1774.

- 
- Geserick, C., Meyer, H. A., and Haendler, B. (2005). The role of DNA response elements as allosteric modulators of steroid receptor function. *Mol Cell Endocrinol* 236, 1-7.
- Gillis, S., Crabtree, G. R., and Smith, K. A. (1979). Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J Immunol* 123, 1624-1631.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
- Glimcher, L. H., and Murphy, K. M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 14, 1693-1711.
- Gottlicher, M., Heck, S., and Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 76, 480-489.
- Gocke, A. R., Cravens, P. D., Ben, L-H., Hussain, R. Z., Northrop, S. C., Racke, M. K., and Lovett-Racke, A. E. (2007). T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *J Immunol*, 1341-1348.
- Green, J. M., Noel, P. J., Sperling, A. I., Walunas, T. L., Gray, G. S., Bluestone, J. A., and Thompson, C. B. (1994). Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1, 501-508.
- Gu, L., Tseng, S., Horner, R. M., Tam, C., Loda, M., and Rollins, B. J. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404, 407-411.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hawrylowicz, C. M., Guida, L., and Paleolog, E. (1994). Dexamethasone up-regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression on human monocytes. *Immunology* 83, 274-280.

- 
- Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., Herrlich, P., and Cato, A. C. (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *Embo J* *13*, 4087-4095.
- Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C., and Karin, M. (1995). Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *Embo J* *14*, 452-460.
- Hittelman, A. B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J. A., Freedman, L. P., and Garabedian, M. J. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *Embo J* *18*, 5380-5388.
- Ho, I. C., Vorhees, P., Marin, N., Oakley, B. K., Tsai, S. F., Orkin, S. H., and Leiden, J. M. (1991). Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *Embo J* *10*, 1187-1192.
- Ho, I. C., Hodge, M. R., Rooney, J. W., and Glimcher, L. H. (1996). The proto-oncogene *c-maf* is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* *85*, 973-983.
- Ho, I. C., Lo, D., and Glimcher, L. H. (1998). *c-maf* promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* *188*, 1859-1866.
- Hoijsman, E., Rocha Viegas, L., Keller Sarmiento, M. I., Rosenstein, R. E., and Pecci, A. (2004). Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* *145*, 418-425.
- Hollenberg, S. M., and Evans, R. M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* *55*, 899-906.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* *260*, 547-549.

- Hu, X., Li, W. P., Meng, C., and Ivashkiv, L. B. (2003). Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* *170*, 4833-4839.
- Hwang, E. S., Choi, A., and Ho, I. C. (2002). Transcriptional regulation of GATA-3 by an intronic regulatory region and fetal liver zinc finger protein 1. *J Immunol* *169*, 248-253.
- Hwang, E. S., Hong, J. H., and Glimcher, L. H. (2005a). IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J Exp Med* *202*, 1289-1300.
- Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L., and Glimcher, L. H. (2005b). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* *307*, 430-433.
- Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S., Cosio, B., Ito, M., Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (2006). Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med* *203*, 7-13.
- Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H., and Imai, K. (2002). Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* *16*, 2382-2392.
- Jain, J., Loh, C., and Rao, A. (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* *7*, 333-342.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Paul, W. E., and Sher, A. (2000). Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol* *164*, 3047-3055.
- Jee, Y. K., Gilmour, J., Kelly, A., Bowen, H., Richards, D., Soh, C., Smith, P., Hawrylowicz, C., Cousins, D., Lee, T., and Lavender, P. (2005). Repression of interleukin-5 transcription by the glucocorticoid receptor targets GATA3 signaling and involves histone deacetylase recruitment. *J Biol Chem* *280*, 23243-23250.



Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.

Jondal, M., Pazirandeh, A., and Okret, S. (2004). Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol* 25, 595-600.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.

Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T., and Grusby, M. J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174-177.

Kaplan, M. H., Wurster, A. L., and Grusby, M. J. (1998). A signal transducer and activator of transcription (Stat)4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J Exp Med* 188, 1191-1196.

Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M., and Cato, A. C. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J* 20, 7108-7116.

Kim, J. I., Ho, I. C., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10, 745-751.

Klein-Hessling, S., Jha, M. K., Santner-Nanan, B., Berberich-Siebelt, F., Baumruker, T., Schimpl, A., and Serfling, E. (2003). Protein kinase A regulates GATA-3-dependent activation of IL-5 gene expression in Th2 cells. *J Immunol* 170, 2956-2961.

Kovalovsky, D., Paez Pereda, M., Sauer, J., Perez Castro, C., Nahmod, V. E., Stalla, G. K., Holsboer, F., and Arzt, E. (1998). The Th1 and Th2 cytokines IFN-gamma and IL-4

---

antagonize the inhibition of monocyte IL-1 receptor antagonist by glucocorticoids: involvement of IL-1. *Eur J Immunol* 28, 2075-2085.

Kovalovsky, D., Refojo, D., Holsboer, F., and Arzt, E. (2000). Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *J Neuroimmunol* 109, 23-29.

Kull, F. C., Jr. (1988). Reduction in tumor necrosis factor receptor affinity and cytotoxicity by glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun* 153, 402-409.

Kurata, H., Lee, H. J., O'Garra, A., and Arai, N. (1999). Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 11, 677-688.

Lasa, M., Abraham, S. M., Boucheron, C., Saklatvala, J., and Clark, A. R. (2002). Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol Cell Biol* 22, 7802-7811.

Lechner, J., Welte, T., and Doppler, W. (1997). Mechanism of interaction between the glucocorticoid receptor and Stat5: role of DNA-binding. *Immunobiology* 198, 112-123.

Lederer, J. A., Liou, J. S., Todd, M. D., Glimcher, L. H., and Lichtman, A. H. (1994). Regulation of cytokine gene expression in T helper cell subsets. *J Immunol* 152, 77-86.

Lederer, J. A., Perez, V. L., DesRoches, L., Kim, S. M., Abbas, A. K., and Lichtman, A. H. (1996). Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J Exp Med* 184, 397-406.

Lee, G. R., Fields, P. E., and Flavell, R. A. (2001). Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity* 14, 447-459.

- Lee, H. C., Shibata, H., Ogawa, S., Maki, K., and Ikuta, K. (2005). Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor. *J Immunol* *174*, 7800-7806.
- Lee, H. J., Koyano-Nakagawa, N., Naito, Y., Nishida, J., Arai, N., Arai, K., and Yokota, T. (1993). cAMP activates the IL-5 promoter synergistically with phorbol ester through the signaling pathway involving protein kinase A in mouse thymoma line EL-4. *J Immunol* *151*, 6135-6142.
- Lee, H. J., Masuda, E. S., Arai, N., Arai, K., and Yokota, T. (1995). Definition of cis-regulatory elements of the mouse interleukin-5 gene promoter. Involvement of nuclear factor of activated T cell-related factors in interleukin-5 expression. *J Biol Chem* *270*, 17541-17550.
- Lee, H. J., Takemoto, N., Kurata, H., Kamogawa, Y., Miyatake, S., O'Garra, A., and Arai, N. (2000). GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp Med* *192*, 105-115.
- Lenschow, D. J., Herold, K. C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Qin, H. Y., Fuchs, E., Singh, B., Thompson, C. B., and Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* *5*, 285-293.
- Liberman, A. C., Refojo, D., and Arzt, E. (2003). Cytokine signaling/transcription factor cross-talk in T cell activation and Th1-Th2 differentiation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* *51*, 351-365.
- Liberman, A.C., Druker, J., Perone, J.M., and Arzt, E. (2006.) Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Rev. Cytokine and Growth Factors*. (En prensa).
- Liden, J., Delaunay, F., Rafter, I., Gustafsson, J., and Okret, S. (1997). A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation. *J Biol Chem* *272*, 21467-21472.

- 
- Lighvani, A. A., Frucht, D. M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B. D., Nguyen, B. V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W. E., and O'Shea, J. J. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15137-15142.
- Lin, B., Williams-Skipp, C., Tao, Y., Schleicher, M. S., Cano, L. L., Duke, R. C., and Scheinman, R. I. (1999). NF-kappaB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ* 6, 570-582.
- Loots, G. G., Locksley, R. M., Blankespoor, C. M., Wang, Z. E., Miller, W., Rubin, E. M., and Frazer, K. A. (2000). Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* 288, 136-140.
- Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M. P., Ruggi, F. S., De Carli, M., Ricci, M., and Romagnani, S. (1992). Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148, 2142-2147.
- Maggirwar, S. B., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (1997). Regulation of the interleukin-2 CD28-responsive element by NF-ATp and various NF-kappaB/Rel transcription factors. *Mol Cell Biol* 17, 2605-2614.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999). CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189, 587-592.
- Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 15, 163-176.
- McKean, D. J., Bell, M., Huntoon, C., Rastogi, S., Van Norstrand, M., Podzorski, R., Nilson, A., and Paya, C. (1995). IL-1 receptor and TCR signals synergize to activate NF-kappa B-mediated gene transcription. *Int Immunol* 7, 9-20.

- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., *et al.* (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-442.
- Meyer, A. S., and Schmidt, T. J. (1997). Differential effects of agonist and antagonists on autoregulation of glucocorticoid receptors in a rat colonic adenocarcinoma cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62, 97-105.
- Mittelstadt, P. R., and Ashwell, J. D. (2001). Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* 276, 29603-29610.
- Miyaura, H., and Iwata, M. (2002). Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol* 168, 1087-1094.
- Mori, A., Kaminuma, O., Mikami, T., Hoshino, A., Ohmura, T., Miyazawa, K., Suko, M., and Okudaira, H. (1997a). Dissection of human IL-5 promoter--essential role of CLEO element in human IL-5 gene transcription. *Int Arch Allergy Immunol* 113, 272-274.
- Mori, A., Kaminuma, O., Suko, M., Inoue, S., Ohmura, T., Hoshino, A., Asakura, Y., Miyazawa, K., Yokota, T., Okumura, Y., *et al.* (1997b). Two distinct pathways of interleukin-5 synthesis in allergen-specific human T-cell clones are suppressed by glucocorticoids. *Blood* 89, 2891-2900.
- Mori, S., Murakami-Mori, K., and Bonavida, B. (1998). Dexamethasone enhances expression of membrane and soluble interleukin-6 receptors by prostate carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 18, 4403-4408.
- Morishima, Y., Murphy, P. J., Li, D. P., Sanchez, E. R., and Pratt, W. B. (2000). Stepwise assembly of a glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex resolves two sequential ATP-dependent events involving first hsp70 and then hsp90 in opening of the steroid binding pocket. *J Biol Chem* 275, 18054-18060.

- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Mozo, L., Gayo, A., Suarez, A., Rivas, D., Zamorano, J., and Gutierrez, C. (1998). Glucocorticoids inhibit IL-4 and mitogen-induced IL-4R alpha chain expression by different posttranscriptional mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 102, 968-976.
- Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T., and Matsushima, K. (1994). Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 269, 13289-13295.
- Mullen, A. C., High, F. A., Hutchins, A. S., Lee, H. W., Villarino, A. V., Livingston, D. M., Kung, A. L., Cereb, N., Yao, T. P., Yang, S. Y., and Reiner, S. L. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910.
- Muller Igaz, L., Refojo, D., Costas, M. A., Holsboer, F., and Arzt, E. (2002). CRE-mediated transcriptional activation is involved in cAMP protection of T-cell receptor-induced apoptosis but not in cAMP potentiation of glucocorticoid-mediated programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1542, 139-148.
- Murphy, E., Shibuya, K., Hosken, N., Openshaw, P., Maino, V., Davis, K., Murphy, K., and O'Garra, A. (1996). Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* 183, 901-913.
- Murphy, E. E., Terres, G., Macatonia, S. E., Hsieh, C. S., Mattson, J., Lanier, L., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K., and O'Garra, A. (1994). B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* 180, 223-231.
- Murphy, K. M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, S., Asnagli, H., Afkarian, M., and Murphy, T. L. (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* 18, 451-494.

- 
- Neurath, M. F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, P. R., *et al.* (2002). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 195, 1129-1143.
- Nissen, R. M., and Yamamoto, K. R. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14, 2314-2329.
- Noben-Trauth, N., Shultz, L. D., Brombacher, F., Urban, J. F., Jr., Gu, H., and Paul, W. E. (1997). An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10838-10843.
- Novac, N., Baus, D., Dostert, A., and Heinzl, T. (2006). Competition between glucocorticoid receptor and NFkappaB for control of the human FasL promoter. *Faseb J* 20, 1074-1081.
- O'Shea, J. J., and Paul, W. E. (2002). Regulation of T(H)1 differentiation--controlling the controllers. *Nat Immunol* 3, 506-508.
- O'Shea, J. J., Park, H., Pesu, M., Borie, D., and Changelian, P. (2005). New strategies for immunosuppression: interfering with cytokines by targeting the Jak/Stat pathway. *Curr Opin Rheumatol* 17, 305-311.
- Orphanides, G., and Reinberg, D. (2000). RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* 407, 471-475.
- Orphanides, G., and Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-451.
- Orti, E., Mendel, D. B., Smith, L. I., and Munck, A. (1989). Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. *J Biol Chem* 264, 9728-9731.

- Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., and Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* *9*, 745-755.
- Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., and Murphy, K. M. (2000). Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* *12*, 27-37.
- Paez-Pereda, M., Giacomini, D., Refojo, D., Nagashima, A. C., Hopfner, U., Grubler, Y., Chervin, A., Goldberg, V., Goya, R., Hentges, S. T., *et al.* (2003). Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 1034-1039.
- Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, I., Abrams, J., de Vries, J., and Spits, H. (1988). Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol* *141*, 849-855.
- Paul, W. E., and Seder, R. A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* *76*, 241-251.
- Pearce, D., Matsui, W., Miner, J. N., and Yamamoto, K. R. (1998). Glucocorticoid receptor transcriptional activity determined by spacing of receptor and nonreceptor DNA sites. *J Biol Chem* *273*, 30081-30085.
- Peng, S. L. (2006). The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* *3*, 87-95.
- Penix, L. A., Sweetser, M. T., Weaver, W. M., Hoeffler, J. P., Kerppola, T. K., and Wilson, C. B. (1996). The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates selective expression in T cells. *J Biol Chem* *271*, 31964-31972.
- Pfifner, E., Jahne, R., Wissler, M., Stoecklin, E., and Groner, B. (1998). p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* *12*, 1582-1593.



- Pratt, D. S., Fawaz, K. A., Rabson, A., Dellelis, R., and Kaplan, M. M. (1997). A novel histological lesion in glucocorticoid-responsive chronic hepatitis. *Gastroenterology* *113*, 664-668.
- Qiu, Y., Zhao, Y., Becker, M., John, S., Parekh, B. S., Huang, S., Hendarwanto, A., Martinez, E. D., Chen, Y., Lu, H., *et al.* (2006). HDAC1 acetylation is linked to progressive modulation of steroid receptor-induced gene transcription. *Mol Cell* *22*, 669-679.
- Quan, A., McCall, M. N., and Sewell, W. A. (2001). Dexamethasone inhibits the binding of nuclear factors to the IL-5 promoter in human CD4 T cells. *J Allergy Clin Immunol* *108*, 340-348.
- Raiden, S., Polack, E., Nahmod, V., Labeur, M., Holsboer, F., and Arzt, E. (1995). TRH receptor on immune cells: in vitro and in vivo stimulation of human lymphocyte and rat splenocyte DNA synthesis by TRH. *J Clin Immunol* *15*, 242-249.
- Ramirez, F. (1998). Glucocorticoids induce a Th2 response in vitro. *Dev Immunol* *6*, 233-243.
- Ranganath, S., Ouyang, W., Bhattacharya, D., Sha, W. C., Grupe, A., Peltz, G., and Murphy, K. M. (1998). GATA-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. *J Immunol* *161*, 3822-3826.
- Ranger, A. M., Hodge, M. R., Gravallesse, E. M., Oukka, M., Davidson, L., Alt, F. W., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Grusby, M., and Glimcher, L. H. (1998). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* *8*, 125-134.
- Ray, A., and Prefontaine, K. E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 752-756.

- 
- Reed, J. C., Abidi, A. H., Alpers, J. D., Hoover, R. G., Robb, R. J., and Nowell, P. C. (1986). Effect of cyclosporin A and dexamethasone on interleukin 2 receptor gene expression. *J Immunol* *137*, 150-154.
- Refojo, D., Liberman, A. C., Holsboer, F., and Arzt, E. (2001). Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* *79*, 385-394.
- Refojo, D., Liberman, A. C., Giacomini, D., Carbia Nagashima, A., Graciarena, M., Echenique, C., Paez Pereda, M., Stalla, G., Holsboer, F., and Arzt, E. (2003). Integrating systemic information at the molecular level: cross-talk between steroid receptors and cytokine signaling on different target cells. *Ann N Y Acad Sci* *992*, 196-204.
- Reichardt, H. M., Tuckermann, J. P., Gottlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P., and Schutz, G. (2001). Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *Embo J* *20*, 7168-7173.
- Reiner, S. L. (2001). Helper T cell differentiation, inside and out. *Curr Opin Immunol* *13*, 351-355.
- Reiner, S. L., Mullen, A. C., Hutchins, A. S., and Pearce, E. L. (2003). Helper T cell differentiation and the problem of cellular inheritance. *Immunol Res* *27*, 463-468.
- Riccardi, C., Bruscoli, S., and Migliorati, G. (2002). Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharmacol Res* *45*, 361-368.
- Rider, L. G., Hirasawa, N., Santini, F., and Beaven, M. A. (1996). Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is suppressed by low concentrations of dexamethasone in mast cells. *J Immunol* *157*, 2374-2380.
- Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* *185*, 461-469.

- 
- Robinson, D. S., and O'Garra, A. (2002). Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* 16, 755-758.
- Rocha-Viegas, L., Vicent, G. P., Baranao, J. L., Beato, M., and Pecci, A. (2006). Glucocorticoids repress bcl-X expression in lymphoid cells by recruiting STAT5B to the P4 promoter. *J Biol Chem* 281, 33959-33970.
- Rogatsky, I., Logan, S. K., and Garabedian, M. J. (1998). Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2050-2055.
- Rupprecht, R., Arriza, J. L., Spengler, D., Reul, J. M., Evans, R. M., Holsboer, F., and Damm, K. (1993). Transactivation and synergistic properties of the mineralocorticoid receptor: relationship to the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 7, 597-603.
- Sakai, D. D., Helms, S., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J. A., Rottman, F. M., and Yamamoto, K. R. (1988). Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev* 2, 1144-1154.
- Salomon, B., and Bluestone, J. A. (1998). LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol* 161, 5138-5142.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sapi, E., Flick, M. B., Gilmore-Hebert, M., Rodov, S., and Kacinski, B. M. (1995). Transcriptional regulation of the c-fms (CSF-1R) proto-oncogene in human breast carcinoma cells by glucocorticoids. *Oncogene* 10, 529-542.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., and Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21, 55-89.

- Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., and Baldwin, A. S., Jr. (1995a). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-286.
- Scheinman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., and Baldwin, A. S., Jr. (1995b). Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15, 943-953.
- Schoenmakers, E., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W., and Claessens, F. (2000). Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J Biol Chem* 275, 12290-12297.
- Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M., and Evans, R. M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217-1226.
- Schwenger, G. T., Kok, C. C., Arthaningtyas, E., Thomas, M. A., Sanderson, C. J., and Mordvinov, V. A. (2002). Specific activation of human interleukin-5 depends on de novo synthesis of an AP-1 complex. *J Biol Chem* 277, 47022-47027.
- Seder, R. A., and Paul, W. E. (1994). Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12, 635-673.
- Seki, N., Miyazaki, M., Suzuki, W., Hayashi, K., Arima, K., Myburgh, E., Izuhara, K., Brombacher, F., and Kubo, M. (2004). IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation. *J Immunol* 172, 6158-6166.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., *et al.* (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380, 630-633.
- Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N., and Young, H. A. (1997). Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 272, 30412-30420.

- Siegel, M. D., Zhang, D. H., Ray, P., and Ray, A. (1995). Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLE0 elements. *J Biol Chem* 270, 24548-24555.
- Smits, H. H., van Rietschoten, J. G., Hilkens, C. M., Sayilir, R., Stiekema, F., Kapsenberg, M. L., and Wierenga, E. A. (2001). IL-12-induced reversal of human Th2 cells is accompanied by full restoration of IL-12 responsiveness and loss of GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 31, 1055-1065.
- So, E. Y., Kim, S. H., Park, H. H., Cho, B. S., and Lee, C. E. (2002). Corticosteroid inhibits IL-4 signaling through down-regulation of IL-4 receptor and STAT6 activity. *FEBS Lett* 518, 53-59.
- Spector, D. L., Goldman, R. D., and Leinwand, L. A. (1998). *Cells : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Stranick, K. S., Zambas, D. N., Uss, A. S., Egan, R. W., Billah, M. M., and Umland, S. P. (1997). Identification of transcription factor binding sites important in the regulation of the human interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 272, 16453-16465.
- Swantek, J. L., Cobb, M. H., and Geppert, T. D. (1997). Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 17, 6274-6282.
- Swartz, S. L., and Dluhy, R. G. (1978). Corticosteroids: clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 16, 238-255.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., and Glimcher, L. H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295, 338-342.

- Takemoto, N., Koyano-Nakagawa, N., Yokota, T., Arai, N., Miyatake, S., and Arai, K. (1998). Th2-specific DNase I-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. *Int Immunol* *10*, 1981-1985.
- Takemoto, N., Arai, K., and Miyatake, S. (2002). Cutting edge: the differential involvement of the N-finger of GATA-3 in chromatin remodeling and transactivation during Th2 development. *J Immunol* *169*, 4103-4107.
- Tao, Y., Williams-Skipp, C., and Scheinman, R. I. (2001). Mapping of glucocorticoid receptor DNA binding domain surfaces contributing to transrepression of NF-kappa B and induction of apoptosis. *J Biol Chem* *276*, 2329-2332.
- Tato, C. M., Laurence, A., and O'Shea, J. J. (2006). Helper T cell differentiation enters a new era: le roi est mort; vive le roi! *J Exp Med* *203*, 809-812.
- Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Sangster, M. Y., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G. C., and Ihle, J. N. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* *382*, 171-174.
- Thomas, M. A., Mordvinov, V. A., and Sanderson, C. J. (1999). The activity of the human interleukin-5 conserved lymphokine element 0 is regulated by octamer factors in human cells. *Eur J Biochem* *265*, 300-307.
- Traenckner, E. B., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. (1995). Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* *14*, 2876-2883.
- Vacca, A., Felli, M. P., Farina, A. R., Martinotti, S., Maroder, M., Screpanti, I., Meco, D., Petrangeli, E., Frati, L., and Gulino, A. (1992). Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J Exp Med* *175*, 637-646.

- Vacchio, M. S., and Ashwell, J. D. (1997). Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J Exp Med* *185*, 2033-2038.
- Visser, J., van Boxel-Dezaire, A., Methorst, D., Brunt, T., de Kloet, E. R., and Nagelkerken, L. (1998). Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood* *91*, 4255-4264.
- von Laue, S., Finidori, J., Maamra, M., Shen, X. Y., Justice, S., Dobson, P. R., and Ross, R. J. (2000). Stimulation of endogenous GH and interleukin-6 receptors selectively activates different Jaks and Stats, with a Stat5 specific synergistic effect of dexamethasone. *J Endocrinol* *165*, 301-311.
- Wang, J., Shannon, M. F., and Young, I. G. (2006a). A role for Ets1, synergizing with AP-1 and GATA-3 in the regulation of IL-5 transcription in mouse Th2 lymphocytes. *Int Immunol* *18*, 313-323.
- Wang, Y., Campbell, H. D., and Young, I. G. (1993). Sex hormones and dexamethasone modulate interleukin-5 gene expression in T lymphocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* *44*, 203-210.
- Wang, Z. Y., Kusam, S., Munugalavadla, V., Kapur, R., Brutkiewicz, R. R., and Dent, A. L. (2006b). Regulation of Th2 cytokine expression in NKT cells: unconventional use of Stat6, GATA-3, and NFAT2. *J Immunol* *176*, 880-888.
- Webster, J. C., Jewell, C. M., Bodwell, J. E., Munck, A., Sar, M., and Cidlowski, J. A. (1997). Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem* *272*, 9287-9293.
- Weigmann, B., and Neurath, M. F. (2002). T-bet and mucosal Th1 responses in the gastrointestinal tract. *Gut* *51*, 301-303.
- Wenner, C. A., Szabo, S. J., and Murphy, K. M. (1997). Identification of IL-4 promoter elements conferring Th2-restricted expression during T helper cell subset development. *J Immunol* *158*, 765-773.

- Winoto, A., and Littman, D. R. (2002). Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell 109 Suppl*, S57-66.
- Wissink, S., van Heerde, E. C., vand der Burg, B., and van der Saag, P. T. (1998). A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids. *Mol Endocrinol 12*, 355-363.
- Wu, C. Y., Wang, K., McDyer, J. F., and Seder, R. A. (1998). Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol 161*, 2723-2730.
- Yang-Yen, H. F., Chambard, J. C., Sun, Y. L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J., and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell 62*, 1205-1215.
- Ye, J., Cippitelli, M., Dorman, L., Ortaldo, J. R., and Young, H. A. (1996). The nuclear factor YY1 suppresses the human gamma interferon promoter through two mechanisms: inhibition of AP1 binding and activation of a silencer element. *Mol Cell Biol 16*, 4744-4753.
- Yin, Z., Chen, C., Szabo, S. J., Glimcher, L. H., Ray, A., and Craft, J. (2002). T-Bet expression and failure of GATA-3 cross-regulation lead to default production of IFN-gamma by gammadelta T cells. *J Immunol 168*, 1566-1571.
- Young, H. A., and Hardy, K. J. (1990). Interferon-gamma: producer cells, activation stimuli, and molecular genetic regulation. *Pharmacol Ther 45*, 137-151.
- Zacharchuk, C. M., Mercep, M., Chakraborti, P. K., Simons, S. S., Jr., and Ashwell, J. D. (1990). Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J Immunol 145*, 4037-4045.
- Zaret, K. S., and Yamamoto, K. R. (1984). Reversible and persistent changes in chromatin structure accompany activation of a glucocorticoid-dependent enhancer element. *Cell 38*, 29-38.



---

Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., and Ray, A. (1997a). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 272, 21597-21603.

Zhang, D. H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P., and Ray, A. (1999). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11, 473-482.

Zhang, Z., Jones, S., Hagood, J. S., Fuentes, N. L., and Fuller, G. M. (1997b). STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* 272, 30607-30610.

Zheng, W., and Flavell, R. A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.

Zhu, J., Min, B., Hu-Li, J., Watson, C. J., Grinberg, A., Wang, Q., Killeen, N., Urban, J. F., Guo, L., and Paul, W. E. (2004). Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 5, 1157-1165.