



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

Dipartimento di Patologia

Dottorato di ricerca in
BIOLOGIA e PATOLOGIA MOLECOLARE e CELLULARE
Ciclo XX

Dissociazione nell'espressione di IL-12 e IL-23 in cellule dendritiche umane. Ruolo nella differenziazione di Th17

MED/04

Coordinatore: Prof. Marco Antonio Cassatella

Tutor: Dott.ssa Franca Gerosa

Dottoranda: Barbara Baldani Guerra

28 febbraio 2008

INDICE

Abbreviazioni	5
Introduzione	7
• Le cellule dendritiche	7
• La famiglia dell'IL-12	9
• Recettori per il riconoscimento di strutture conservate derivate da microorganismi	11
Obiettivi	15
Materiali e Metodi	17
• Anticorpi	17
• Reagenti	17
• Isolamento cellulare e condizioni di coltura	18
• Dosaggio di citochine mediante test ELISA	19
• Genotipizzazione di NOD2	19
• Radiomarcatura con [³⁵ S]metionina	19
• Immunoprecipitazione di IL-12 e IL-23 radiomarcate	20
• Quantificazione dell'accumulo di mRNA	20
• Analisi statistica	20
Risultati	21
• Identificazione di IL-12, IL-23 e IL-12p40 libera, con esperimenti di immunoprecipitazione	21

- *Mycobacterium tuberculosis* inattivato, da solo o in combinazione con altri stimoli, induce un'espressione differenziale di IL-12 e IL-23 22
- Il ligando per NOD2 associato al ligando per TLR2 mima l'induzione di IL-12 e IL-23 da parte del *Mycobacterium tuberculosis* 25
- Lo zymosan regola in maniera diversa la produzione di IL-12 e IL-23 28
- L'associazione di ligandi per dectin-1 e TLR2 mima l'induzione di IL-12 da parte dello zymosan 30
- I ligandi per TLR2 inibiscono la produzione di IL-12 da mono-DC indotta dalla combinazione di altri ligandi per PRRs 34
- IL-10 è indotta da ligandi per TLR2 ma non è responsabile dell'inibizione della produzione di IL-12p75 37
- I sopranatanti di mono-DC stimulate con PAMPs inducono cellule T CD4⁺ *naive* umane a produrre IL-17 e IFN- γ 38

Discussione 43

Bibliografia 51

ABBREVIAZIONI

APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>
Dectin-1	<i>Dendritic cell associated c-type lectin-1</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor</i>
IL	<i>Interleukin</i>
kDa	<i>Kilo Dalton</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MDP	<i>Muramyl Dipeptide</i>
NOD2	<i>Nucleotide Binding Oligomerization Domain</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SE	<i>Standard Error</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>

INTRODUZIONE

Le cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) sono una eterogenea popolazione di cellule immunitarie derivate dal midollo osseo che hanno un ruolo importante nella regolazione della risposta immunitaria innata a numerosi antigeni, inclusi batteri e agenti virali. Le cellule dendritiche sono APC (Antigen Presenting Cell) cruciali per le risposte immunitarie innate e adattative verso gli antigeni e sono importanti anche per il mantenimento della tolleranza immunologica agli auto-antigeni (Banchereau *and* Steinman, 1998). Le DC regolano sia la qualità che la durata della risposta immunitaria e l'abilità delle DC di attivare le cellule T *naive* dipende dalla loro maturazione che è determinata principalmente da segnali provenienti dall'incontro con microorganismi patogeni.

Una volta attivate dalle DC le cellule T possono completare la risposta immunitaria interagendo con altre cellule come le cellule B per la produzione di anticorpi, con i macrofagi per il rilascio di citochine e con le cellule bersaglio per la lisi. La maturazione delle DC da parte dei microorganismi comporta delle modificazioni che le rendono adatte all'attivazione dei linfociti T *naive* nei siti della risposta secondaria (Figura 1.). In primo luogo le DC mature subiscono una forte riduzione nella capacità di catturare l'antigene a favore di una elevata e prolungata espressione dell'antigene in contesto di MHC (Major Histocompatibility Complex). I linfociti T riconoscono gli antigeni presentati in contesto di MHC e questo segnale determina la specificità della risposta per l'antigene mediata dalle cellule T, ma in assenza di un secondo segnale stimolatorio, dà luogo ad anergia (Eagar *et al.*, 2002). Le DC mature esprimono quindi molecole di costimolazione, in particolare B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) che interagiscono con CD28 espresso alla superficie dei linfociti T *naive* inducendo la loro proliferazione. L'interazione con microorganismi patogeni induce inoltre la produzione di IL-12, da parte delle DC, che determina una polarizzazione nella differenziazione dei linfociti T CD4⁺ *naive* in linfociti Th1. I linfociti Th1 producono citochine come IFN- γ che induce prevalentemente risposte cellulari caratterizzate da infiammazione locale e attivazione di macrofagi che portano all'eliminazione di patogeni intracellulari.

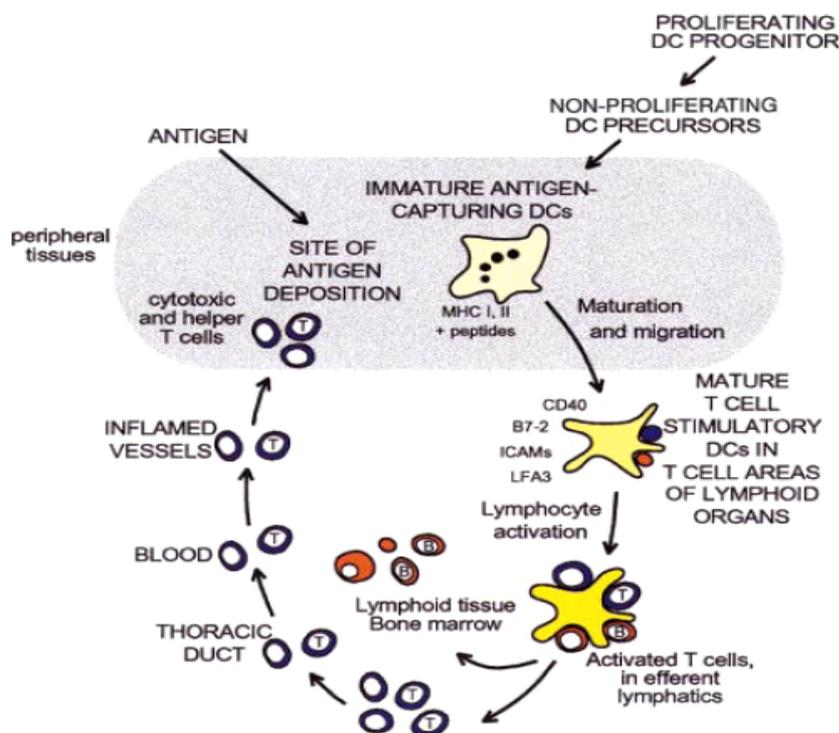


Figura 1. Rappresentazione schematica del ruolo delle DC nella presentazione antigenica: gli antigeni sono catturati dalle DC nei tessuti periferici e processati per formare complessi peptide-molecole MHC. In seguito all'incontro con microorganismi o con strutture da essi derivate, le DC maturano ed esprimono molecole che saranno coinvolte nella stimolazione delle cellule T negli organi linfoidi secondari. In seguito ad attivazione i linfociti T (blu) proliferano attivamente dando origine a cellule effettrici che migrano nei tessuti infiammati. (da Banchereau *and* Steinman, 1998)

Nel sangue umano sono state descritte myDC (DC mieloidi) $CD11c^{high}$ $CD123^{-}$ e pDC (DC plasmacitoidi) $CD11c^{low}$ $CD123^{+}$ (Banchereau *et al.*, 2000) che rappresentano meno dell'1% delle cellule mononucleate del sangue, migrano costitutivamente alle aree T degli organi linfoidi secondari e sono virtualmente assenti dai tessuti non linfoidi ma possono essere reclutate nel sito interessato da una infiammazione.

La maggior parte degli esperimenti funzionali con cellule dendritiche prevede il differenziamento di cellule dendritiche $CD1a^{+}$ dai monociti isolati da sangue periferico trattati in coltura per 5 giorni con GM-CSF e IL-4 (Sallusto *and* Lanzavecchia, 1994).

La famiglia dell'IL-12

IL-12 è una citochina eterodimerica di 70 kDa (IL-12p75) composta da due subunità: la subunità p40 (catena pesante di 40 kDa) e la subunità p35 (catena leggera di 35 kDa) legate covalentemente (Kobayashi *et al.*, 1989). La subunità p35 ha omologia con altre citochine a singola catena (come IL-6) mentre la subunità p40 è strutturalmente correlata al dominio extracellulare (Hematopoietin Receptor Domain) della famiglia dei recettori delle citochine ematopoietiche (come IL-6 R α). IL-12 potrebbe essere evoluta da una citochina primordiale della famiglia dell'IL-6 legata al suo recettore (Merberg *et al.*, 1992) (Figura 2.).

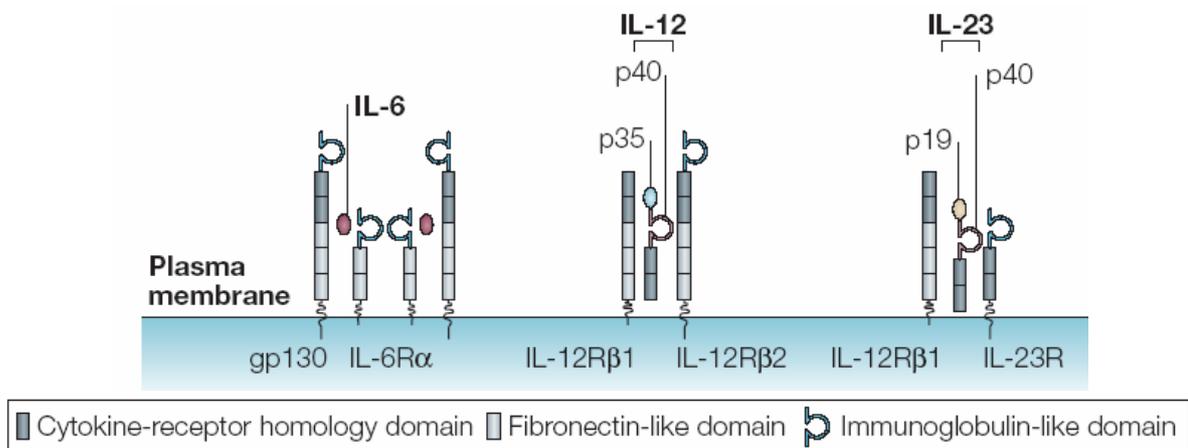


Figura 2. Rappresentazione di IL-6, IL-12, IL-23 e dei loro recettori. IL-6 è una citochina monomericata che forma un complesso con gp130 e con la catena α del recettore di IL-6 (IL-6R α). IL-12 è un eterodimero legato covalentemente composto da una catena leggera (IL-12 p35) e da una catena pesante (IL-12p40); il recettore per IL-12 è composto da IL-12R β 1 e da IL-12R β 2 che hanno entrambi omologia con gp130. La subunità p40 di IL-12 può dimerizzare con IL-23p19 per formare IL-23; il recettore per questo eterodimero è formato dall'associazione di IL-12R β 1 e IL-23R. (da Hunter, 2005)

L'espressione dei geni della subunità p35 e p40 è regolata in maniera indipendente. La produzione di p35 è limitata e strettamente regolata e richiede che ci sia coespressione della p40 perché avvenga la secrezione della citochina biologicamente attiva (Wolf *et al.*, 1991). La subunità p40 sembra essere più promiscua ed è prodotta in quantità maggiori di quelle richieste per la formazione dell'eterodimero p35p40. La p40 libera nel topo può formare omodimeri che sembrano essere inibitori naturali dell'IL-12 (Gillessen *et al.*,

1995). Il recettore di IL-12 è composto da due catene, IL-12 R β 1 e IL-12 R β 2 (Figura 2), che appartengono alla famiglia di recettori gp130 (glycoprotein 130).

A lungo IL-12 è rimasta la sola citochina eterodimerica fino a che non sono state descritte altre citochine eterodimeriche ad essa correlate. Nel 2000 Kastelein, Bazan e colleghi hanno infatti identificato, sulla base di una ricerca per omologia con membri della famiglia di IL-6, la molecola p19 (IL-23p19). La subunità p19, che è strutturalmente correlata alla subunità p35 di IL-12, dimerizza con la subunità p40 di IL-12 formando la citochina IL-23. La formazione di IL-23 biologicamente attiva richiede la sintesi dentro la stessa cellula di entrambe le subunità p19 e p40, come avviene per IL-12.

IL-23 si lega a IL-12R β 1, come ci si aspettava dall'interazione di IL-12p40 con IL-12R β 1 ed ad un'altra porzione di recettore indicato come IL-23R che condivide molte caratteristiche con IL-12R β 2 in particolare il dominio extracellulare N-terminale Ig-like e due domini di omologia del recettore per le citochine. Nell'uomo il recettore per IL-23 è espresso principalmente su cellule T memoria o attivate e su cellule NK (Natural Killer) ma anche a bassi livelli su monociti, macrofagi e cellule dendritiche.

Dato che IL-23 condivide alcune caratteristiche strutturali e funzionali con IL-12, sembrava probabile che IL-23 avesse una funzione nella regolazione delle risposte di tipo Th1. In realtà IL-12 e IL-23 hanno ruoli diversi nella regolazione delle cellule durante l'infezione e l'autoimmunità. IL-12, promuovendo la produzione di IFN- γ , era considerata responsabile dell'autoimmunità fino a quando non sono stati creati modelli animali di autoimmunità usando topi p19^{-/-} (che mancano della subunità p19 e quindi di IL-23) che sono serviti a identificare IL-23, piuttosto che IL-12, come il fattore maggiormente responsabile dell'infiammazione cronica. IL-23 agisce inducendo una particolare sottopopolazione di cellule T helper a produrre IL-17 (Th17) (Aggarwal *et al.*, 2003). Infatti topi che mancano della subunità p19, analogamente a topi che mancano di p40, o nei quali è bloccata IL-17 con anticorpi neutralizzanti, sono resistenti a sviluppare patologie autoimmuni (Cua *et al.*, 2003). Sebbene IL-23, nel topo, giochi un ruolo chiave nei processi infiammatori mediati dalle cellule Th17 non è sufficiente a generare cellule Th17 dai precursori T *naive*. La produzione di IL-17 nel topo richiede infatti la

presenza di fattori essenziali come IL-6 e TGF- β (Veldhoen *et al.*, 2006). Il ruolo di IL-23 nell'induzione di Th17 e nel favorire l'infiammazione cronica non è ancora completamente chiarito. Questa citochina oltre a promuovere la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule Th17 le induce a produrre IL-22 che ha un ruolo cruciale nell'immunità innata a livello dell'epidermide e induce l'espressione di peptidi antimicrobici nei cheratinociti (Wolk *et al.*, 2004). Studi recenti hanno evidenziato che per indurre IL-17 in cellule T CD4⁺ umane è richiesta invece IL-1 β , mentre rimane controverso il ruolo di IL-23 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007).

La produzione di IL-12 è indotta da microorganismi in APC che sono state esposte a citochine come IFN- γ o IL-4, mentre in assenza di questi mediatori la produzione di IL-12 è minima e viene indotta solo una notevole quantità di p40 libera (Trinchieri, 2003). Fino ad ora si sa poco invece sugli stimoli che inducono l'espressione di p19 e la produzione di IL-23.

Recettori per il riconoscimento di strutture conservate derivate da microorganismi

Le cellule del sistema immunitario innato riconoscono strutture molecolari conservate associate ai patogeni, indicate come PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), attraverso i PRRs (Pattern Recognition Receptor) (Medzhitov, 2001; Akira *et al.*, 2006). Ci sono diverse classi di PRRs che includono i recettori Toll-like (TLRs), recettori della famiglia delle lectine e recettori di tipo NOD (Nucleotide Binding Oligomerization Domain)(Figura 3).

La famiglia dei TLRs, di cui sono stati descritti nei mammiferi 12 membri, è stata scoperta con l'identificazione di Toll, un recettore espresso negli insetti e che è stato trovato essere essenziale per stabilire la polarità dorso-ventrale durante l'embriogenesi (Hashimoto *et al.*, 1988). Studi seguenti hanno rilevato che il recettore Toll ha anche un ruolo essenziale nella risposta immunitaria innata degli insetti verso l'infezione fungina (Lemaitre *et al.*, 1996). I TLR sono glicoproteine integrali di membrana di tipo I e sulla base di una notevole omologia nella regione citoplasmatica (dominio TIR:Toll/IL-1R

homology domain), sono membri di una superfamiglia più grande che include il recettore per IL-1 (IL-1 Rs). La regione extra cellulare dei TLRs contiene motivi ripetuti ricchi di leucina LRR (Leucine-Rich-Repeat) coinvolti nel riconoscimento dei patogeni (Akira *and* Takeda, 2004). Nonostante i domini LRR siano conservati, diversi TLRs possono riconoscere parecchi ligandi non correlati strutturalmente.

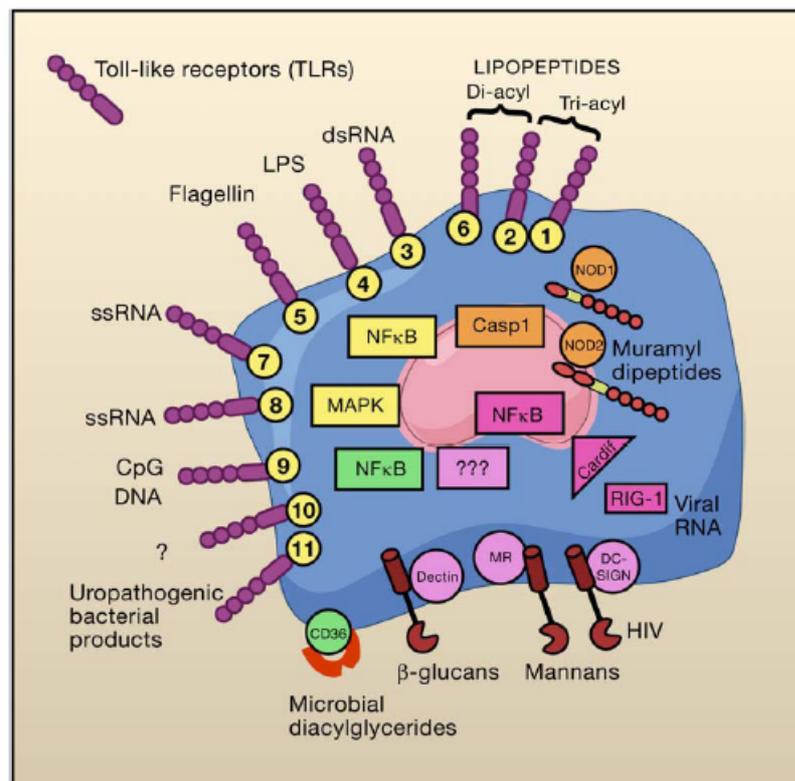


Figura 3. Rappresentazione dei PRRs di superficie e intracellulari e dei loro ligandi coinvolti nell'attivazione delle cellule dendritiche. Alla famiglia dei recettori Toll-like appartengono: TLR2 che è coinvolto nel riconoscimento di molti prodotti microbici tra cui il peptidoglicano, lipoproteine batteriche o sintetiche (quali Pam2C e Pam3C, lipopeptidi rispettivamente di- o tri-acilati), il lipoarabinomannano e derivati della parete dei lieviti; TLR3 riconosce l'RNA a doppia elica; TLR4 rileva principalmente il lipopolissacaride (LPS); TLR5 riconosce la flagellina; TLR9 ha un ruolo essenziale nel riconoscimento di sequenze CpG non metilate del DNA batterico; TLR7 e TLR8 riconoscono l'RNA virale a singola elica oltre a imiquimod e R848 (composti sintetici antivirali imidazoquinolinici). L'associazione del TLR2 con TLR6 permette il riconoscimento dello zymosan (che è un estratto della parete cellulare dei lieviti che è composto principalmente di β-glucano) (Underhill, 1999). L'associazione di TLR2 e TLR1 è coinvolta nel riconoscimento di strutture appartenenti a *Mycobacterium tuberculosis* (Takeuchi, 2002). Il dectin-1 (recettore della famiglia delle lectine) è anche chiamato recettore per il β-glucano e rileva specificatamente β-glucani solubili e particolati e lo zymosan. Patogeni che hanno invaso il citoplasma vengono rilevati dalla famiglia di proteine NOD, che include NOD1 e NOD2 che sono implicate nel riconoscimento di componenti batteriche come il muramyl dipeptide (MDP); NOD2 è associato al riconoscimento di *Mycobacterium tuberculosis* (Ferwerda, 2005). (da Karin, 2006)

Tra i recettori della famiglia delle lectine, il dectin-1 o recettore per il β -glucano, è un piccolo recettore transmembrana di tipo II che contiene un dominio di riconoscimento dei carboidrati lectin-like e un motivo ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) nella sua coda citoplasmatica che è coinvolto nell'attivazione cellulare (Brown *et al.*, 2003). Originariamente si pensava che dectin-1 fosse un recettore specifico delle cellule dendritiche, da ciò infatti deriva il suo nome (dendritic-cell-associated C-type lectin-1), ma il recettore è espresso in molti tipi cellulari inclusi macrofagi, monociti, neutrofili e in una sottopopolazione di cellule T, sebbene non sia espresso su queste cellule in tutti i tessuti. Dectin-1 rileva specificatamente β -glucani solubili e particolati che sono polimeri di carboidrati con attività immuno-modulatoria trovati principalmente nella parete dei funghi, ma anche in piante e in alcuni batteri. Dectin-1 riconosce anche lo zymosan che è un estratto della parete cellulare dei lieviti che è composto principalmente di β -glucano (Brown and Gordon, 2001). Questo recettore transmembrana media varie funzioni cellulari che comprendono il legame, l'internalizzazione e l'uccisione del fungo, in parte attraverso l'induzione di un *burst* respiratorio (Steele *et al.*, 2003) e in parte attraverso la produzione di citochine e chemochine infiammatorie protettive (Brown *et al.*, 2003). Queste attività possono influenzare la risposta immunitaria risultante e nel topo è stato provato che in certe circostanze possono portare a fenomeni di autoimmunità (Yoshitomi *et al.*, 2005).

Patogeni che hanno invaso il citoplasma vengono rilevati da vari PRRs citoplasmatici tra cui la famiglia di proteine NOD (Nucleotide Binding Oligomerization Domain), che include NOD1 e NOD2. Le proteine di questa famiglia possiedono un dominio LRR, simile a quello trovato nei TLRs, che media il riconoscimento del ligando, un dominio NOD e un dominio CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain) per la trasmissione del segnale (Inohara *et al.*, 2005). Queste proteine sono implicate nel riconoscimento di componenti batteriche come il muramil dipeptide (MDP) che è una struttura ripetitiva del peptidoglicano dei batteri. Consistente con questo, macrofagi che mancano sia di NOD1 che NOD2 non sono in grado di produrre citochine in risposta ai corrispondenti ligandi (Kobayashi *et al.*, 2005). Ci sono delle

varianti nel gene umano NOD2 che portano a piccole variazioni (dentro o vicino la regione LRR) nella struttura primaria della proteina. Due di queste varianti, R702W e G908R sono mutazioni puntiformi, mentre la terza 1007fs è una mutazione *frameshift* che porta a delezione degli ultimi trenta aminoacidi della proteina. Queste mutazioni sono correlate ad una maggiore suscettibilità al morbo di Crohn, un'inflammatione cronica dell'intestino (Hugot *et al.*, 2001).

Il riconoscimento contemporaneo con distinti PRRs può avere degli effetti di cooperazione nella risposta innata ai microorganismi, influenzando in tal modo sia positivamente che negativamente la grandezza e la qualità della risposta immune (Trinchieri *and* Sher, 2007). Ad esempio nelle DC, sia umane che di topo, il TLR3 e TLR4 agiscono in sinergia con il TLR7, TLR8 e TLR9 nell'indurre un set selezionato di geni. La stimolazione sinergistica di TLR7/8 con TLR3 o TLR4 aumenta notevolmente la produzione di IL-12 portando così le DC ad aumentare e sostenere le risposte di tipo Th1 (Napolitani *et al.*, 2005).

OBIETTIVI

La somiglianza di struttura tra IL-12 e IL-23 e la condivisione della molecola p40 suggerivano un profilo di espressione comune alle due citochine. Tuttavia l'analisi di espressione di IL-23 è stata a lungo limitata dalla carenza di metodiche disponibili per rilevarne l'espressione a livello proteico.

Lo scopo del nostro lavoro è stato pertanto quello di confrontare l'espressione di IL-12p75, IL-23 e p40 libera in mono-DC stimulate con *Mycobacterium tuberculosis* o zymosan o con combinazioni di strutture molecolari che ne mimano l'attivazione. Abbiamo inoltre valutato la capacità degli stimoli usati di indurre in mono-DC la produzione di fattori solubili che indirizzano la differenziazione di cellule T *naive* umane verso Th17.

MATERIALI E METODI

Anticorpi

Sono stati purificati con Sepharose-protein G (Pharmacia) e legati covalentemente a 1-6 mg/g di biglie CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) i seguenti anticorpi: gli anticorpi murini C11.79 e C8.6 che riconoscono la catena β dell'IL-12 (p40); l'anticorpo murino 12H4 che riconosce la catena α dell'IL-12 (p35), fornito dal dott. S. Wolf, Wyeth (Cambridge, MA); gli anticorpi di topo diretti contro la subunità p19 dell'IL-23 umana, PAB 512 (7G10) appartenente alla sottoclasse mIgG1 e PAB 187 appartenente alla sottoclasse mIgG2a. Per aumentare la capacità di legame sono stati utilizzati gli anticorpi di topo C11.79 insieme con C8.6, oppure l'anticorpo PAB 512 insieme a PAB 187.

In colture di cellule T *naive* sono stati utilizzati: l'anticorpo di topo 19F1.1 in grado di neutralizzare IL-10 (fornito dal dott. K. Moore) a 30 μ g/ml; l'anticorpo murino 1D11 anti TGF- β (fornito dal dott. F. Ruscetti) a 10 μ g/ml e l'antisiero di capra contro IL-6 umana usato 1:100.

Reagenti

Sono stati usati i seguenti reagenti: LPS (Sigma) alla concentrazione di 10 ng/ml oppure 1 μ g/ml, R848 (InvivoGen) 1 μ M, β -Glucano da lievito di birra (Sigma) 10 μ g/ml, Pam3CSK4 (InvivoGen) 200 ng/ml o come indicato nelle legende alle figure, Pam2CSK4 (InvivoGen) 50 ng/ml o come indicato nelle legende alle figure, MALP-2 a 1, 10 o 100 ng/ml (Alexis Biochemicals), zymosan (da *Saccharomyces cerevisiae*, InvivoGen) 10 μ g/ml o 200 μ g/ml, muramyl dipeptide (MDP) (InvivoGen) 10 μ g/ml. H37Rv ottenuto da *Mycobacterium tuberculosis* ucciso al calore è stato così preparato: i batteri sono stati cresciuti in terreno Middlebrook 7H9 addizionato di un complesso di albumina e destrosio e con tween 80 allo 0.05% fino alla fase *mid-log*. Le colture batteriche quindi sono state riscaldate a 80°C per un ora in un bagnetto termostatico e i batteri sono stati raccolti per centrifugazione. Dopo tre lavaggi in terreno RPMI il pellet batterico è stato risospeso alla

concentrazione di 5mg/ml (peso umido). La sospensione batterica è stata aliquotata, conservata a -80°C e usata ad una diluizione 1:15.

Isolamento cellulare e condizioni di coltura

Le cellule dendritiche derivate da monociti (mono-DC) sono state ottenute dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) come descritto in precedenza (Sallusto *and* Lanzavecchia, 1994). In breve, i PBMC sono stati isolati da *buffy coat* di donatori sani (forniti dal centro immunotrasfusionale dell'ospedale di Verona) mediante centrifugazione su gradiente di densità di Ficoll-Paque. I monociti sono stati separati dalla frazione di cellule T mediante centrifugazione su gradiente di densità di Percoll. Le cellule sono state piastrate alla densità di 1.2×10^6 cellule per pozzetto in piastre da 24 pozzetti. Le cellule non aderenti sono state rimosse sfruttando l'aderenza della frazione monocitaria alla plastica. Le cellule aderenti sono state coltivate per 5 giorni in RPMI 1640 con 10% FCS in presenza di IL-4 12ng/ml e GM-CSF 50ng/ml (Schering Plough). L'analisi citofluorimetrica della popolazione cellulare ottenuta ha evidenziato per più del 95% il fenotipo della cellula dendritica immatura (CD1a⁺, HLADR_{low}, CD14⁻, CD83⁻, CD86_{low}, CD80_{low}). Al quinto giorno di coltura le cellule sono state trattate con o senza IFN- γ 1000 U/ml per 18 ore e stimulate con differenti stimoli.

Le cellule dendritiche mieloidi CD1c⁺ sono state ottenute dai PBMC per deplezione dei linfociti B CD19⁺, con microbiglie anti CD19 e in seguito per selezione magnetica positiva con CD1c biotina e biglie anti biotina seguendo le istruzioni della ditta fornitrice (Miltenyi Biotec). Più del 98% delle cellule purificate marcate con streptavidina-PE e analizzate con citofluorimetria di flusso esprimevano CD1c⁺.

I linfociti T helper *naive* CD4⁺CD45RO⁻ sono stati ottenuti dai PBMC per deplezione negativa utilizzando anticorpi anti CD45RO⁺, CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , glicoforina A e destrano secondo le indicazioni della ditta fornitrice (Easy Sep, StemCell Technologies). La frazione cellulare ottenuta, analizzata con citofluorimetria di flusso, risultava essere per più del 99% CD4⁺ e meno del 2% CD45RO⁺. I linfociti T helper *naive*

CD4⁺CD45RO⁻ sono stati quindi risospesi in terreno RPMI 1640 con 10% FCS e piastrati alla densità di 40X10³ cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti nelle quali era stato fatto aderire l'anticorpo umano anti-CD3 (OKT3, eBioscience) alla concentrazione 2.5µg/ml, in presenza dell'anticorpo anti-CD28 (ascite 1:100) e di sopranatanti di mono-DC stimulate con i differenti stimoli. Dopo 5 giorni di coltura, la proliferazione controllata mediante microscopio invertito, era simile per tutte le condizioni. Le cellule sono state lavate per due volte e restimate per 24 ore con l'anticorpo solubile anti-CD3 (OKT3 ascite 1:100) e con PMA (10ng/ml). I surnatanti sono stati raccolti e testati per la produzione di IL-17 e IFN- γ .

Dosaggio di citochine mediante test ELISA

Le cellule dendritiche, preattivate o meno con IFN- γ sono state trattate con i vari stimoli. Dopo 18 ore i sopranatanti sono stati raccolti e testati per la produzione di IL-12 usando gli anticorpi 20C2 e C8.6 biotinilato, IL-23, IL-1 β (eBioscience) e IL-10 usando gli anticorpi 9D7 e 12G8 biotinilato.

I surnatanti dei linfociti T *naive*, dopo 5 giorni di coltura, sono stati testati per la produzione di IL-17 (Bender) e di IFN- γ usando gli anticorpi B133.5 e B133.1 biotinilato.

Genotipizzazione di NOD2

Sono stati selezionati tre pazienti omozigoti per la mutazione L1007fs del gene NOD2 tra un gruppo di pazienti affetti dal morbo di Crohn e già descritti in Giachino *et al.*, 2004. Nei controlli sani è stata esclusa la presenza delle principali mutazioni R702W, G908R, L1007fs associate al morbo di Crohn come già precedentemente descritto (Giachino *et al.*, 2004).

Radiomarcatura con [³⁵S]metionina

Per la marcatura con [³⁵S]metionina, le cellule dendritiche derivate dai monociti e le dendritiche CD1c⁺ pretrattate o meno con IFN- γ , sono state risospese in terreno RPMI 1640 senza metionina con 10% FCS e terreno RPMI normale (con 7% FCS) come fonte di metionina fredda e incubate per 18 ore

con 60 $\mu\text{Ci/ml}$ di [^{35}S]metionina (165 mCi/ml, 1200 Ci/mmol; NEN-DuPont) e gli stimoli.

Immunoprecipitazione di IL-12 e IL-23 radiomarcate

Tutte le procedure per l'immunoprecipitazione sono state eseguite a 4°C. I surnatanti delle cellule sono stati centrifugati per eliminare le cellule residue, quindi sono stati immunoprecipitati dopo l'aggiunta di una soluzione di TBS al 10% (Tris-HCl 10mM, pH 8.2, NaCl 150 mM e 0.02% NaN₃) contenente 1% Nonidet P-40 e leupeptina (Sigma) a 10 $\mu\text{g/ml}$, antipaina (Sigma) a 10 $\mu\text{g/ml}$, EDTA 2 mM e iodoacetamide 2 mM come inibitori di proteasi.

I surnatanti sono stati successivamente trattati con *Sepharose-protein A* e incubati con anticorpi murini legati a sefarosio per due ore in agitazione. Le biglie di sefarosio legate all'anticorpo sono state recuperate per centrifugazione e lavate quattro volte con TBS/0.1% Nonidet P-40 e due volte con Tris-HCl 10 mM pH 8.2, contenente 0.1% di Nonidet P-40. Le proteine immunoprecipitate sono state staccate dalle biglie con il riscaldamento a 100°C per 4 minuti in tampone per SDS-PAGE e separate mediante SDS-PAGE come descritto da Maizel J.V, 1971.

Quantificazione dell'accumulo di mRNA

L'accumulo di mRNA è stato analizzato usando QuantiGene Multiplex assay (Panomics, Fremont, CA). Le mono-DC sono state lisate a 3, 6, e 12 ore con il trattamento in Lysis Mixture. La rilevazione e l'analisi quantitativa dei trascritti presenti nei lisati cellulari è stata effettuata secondo le indicazioni della ditta fornitrice. L'espressione delle molecole di RNA di interesse è stata calcolata come media dei valori provenienti da tre colture cellulari ed è stata normalizzata in rapporto alla ciclofillina B.

Analisi statistica

I risultati sono stati valutati con il test t di Student a due code. Le differenze sono state considerate significative con $p < 0,05$.

RISULTATI

Identificazione di IL-12, IL-23 e IL-12p40 libera, con esperimenti di immunoprecipitazione

Per identificare la catena IL-12p40 secreta da sola o associata con p35 e p19 per formare rispettivamente le citochine eterodimeriche IL-12 e IL-23, sono stati condotti esperimenti di immunoprecipitazione con mono-DC. Le cellule sono state pretrattate o meno con IFN- γ , stimulate con LPS e marcate biosinteticamente con [³⁵S]metionina. I sopranatanti sono stati quindi immunoprecipitati con una miscela di anticorpi anti IL-12/23p40 (C11.79 e C8.6) e analizzati con SDS-PAGE in condizioni non riducenti (Figura 4. a sinistra). Nei sopranatanti delle mono-DC pretrattate o meno con IFN- γ erano visibili due bande principali di 35-40 kDa corrispondenti alle forme glicosilate della catena libera p40 di IL-12 (Carra *et al.*, 2000). Le cellule preattivate con IFN- γ e stimulate con LPS producevano anche l'eterodimero IL-12 (banda di 75kDa) e altre tre bande aggiuntive di 61, 57 e 51 kDa. Per identificare la natura di queste bande intermedie immunoprecipitate dagli anticorpi anti p40, è stata eliminata IL-12p75 dai sopranatanti usando l'anticorpo 12H4 specifico per IL-12p35. I campioni sono quindi stati divisi in due parti uguali e immunoprecipitati con una miscela di anticorpi che riconoscono la catena p19 di IL-23 (PAB 512 e PAB 187) o con una miscela di anticorpi che riconoscono la catena condivisa p40 di IL-12/IL-23 (Figura 4. a destra).

Gli anticorpi anti p19 immunoprecipitano le tre bande di 61, 57 e 51 kDa che corrispondono alle bande intermedie immunoprecipitate dagli anticorpi anti p40. Questi ultimi immunoprecipitano anche due bande che corrispondono alla catena p40 libera. Le tre bande immunoprecipitate sia da anticorpi anti p40 che da anticorpi anti p19, sono identificabili come la catena p19 di IL-23 legata covalentemente a tutte le varianti glicosilate della catena IL-12/IL-23p40 (Carra *et al.*, 2000).

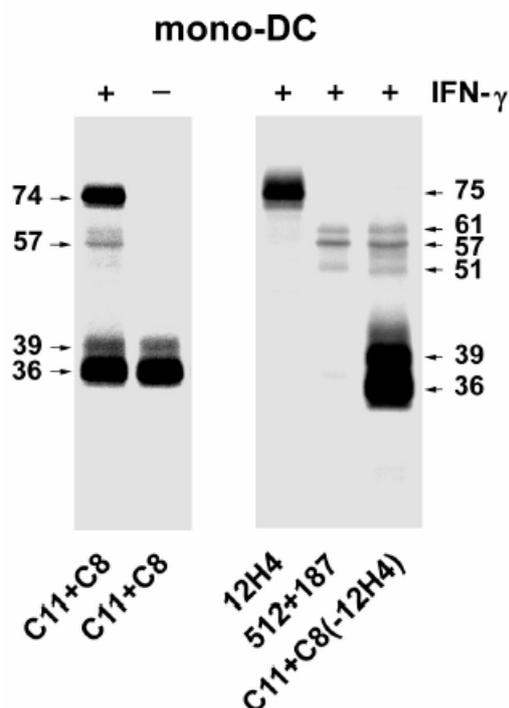


Figura 4. Analisi di IL-12 e IL-23 prodotte da mono-DC con esperimenti di immunoprecipitazione. Mono-DC pretrattate con o senza IFN- γ sono state marcate con [^{35}S] metionina e stimulate con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Dopo 18 ore i soprannatanti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti IL-12p40 (C11.79+C8.6) (immagine a sinistra). I soprannatanti di cellule pretrattate con IFN- γ (immagine a destra) sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti IL-12p35 (12H4) e ogni campione dopo tre passaggi di immunoprecipitazione con l'anticorpo 12H4 è stato diviso in due parti uguali e immunoprecipitato con una miscela di anticorpi anti IL-23p19 (PAB512+PAB187) o con anticorpi anti IL-12p40 (C11.79+C8.6) e analizzato con SDS-PAGE in condizioni non riducenti. La massa molecolare è espressa in kilodalton. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti.

***Mycobacterium tuberculosis* inattivato, da solo o in combinazione con altri stimoli, induce un'espressione differenziale di IL-12 e IL-23**

La produzione di IL-12 e IL-23 da cellule dendritiche umane stimulate con *Mycobacterium tuberculosis* ucciso al calore (ceppo H37Rv) è stata valutata mediante immunoprecipitazione e mediante test ELISA. Considerato che IL-12 è indotta preferenzialmente da una combinazione di ligandi per TLR, cellule dendritiche del sangue periferico CD1c⁺ e mono-DC sono state stimulate con H37Rv da solo o in combinazione con R848 (ligando per TLR7/8). In CD1c⁺ pretrattate con IFN- γ (Figura 5.A), H37Rv induceva la produzione di IL-12p75 e

IL-23; R848 sinergizzava con H37Rv per la produzione di IL-12p75 ma diminuiva in maniera consistente la produzione di IL-23, a differenza di quanto si poteva osservare in cellule stimulate con LPS (non mostrato).

In mono-DC, H37Rv induceva IL-23 ma non IL-12p75 (Figura 5.B), mentre se le cellule venivano pretrattate con IFN- γ , H37Rv da solo induceva una rilevante quantità sia di IL-23 che di IL-12p75. La combinazione di H37Rv e R848 non incrementava la produzione di IL-23, ma aumentava in maniera sinergistica la produzione di IL-12p75 in mono-DC pretrattate sia con che senza IFN- γ . Questi dati di immunoprecipitazione sono stati confermati dai dati dei test ELISA effettuati usando mono-DC ottenute da venti diversi donatori (Figura 5.C). Come si osserva dal grafico, H37Rv da solo non era in grado di indurre produzione di IL-12p75 in mono-DC, ma era efficace quando aggiunto sia assieme a R848 (H37Rv+R848 vs R848 $p=0,005$) sia quando le cellule erano pretrattate con IFN- γ (H37Rv+IFN- γ vs IFN- γ $p=0,004$). Quando mono-DC erano pretrattate con IFN- γ e costimate con H37Rv e R848 producevano una quantità significativamente più elevata di IL-12 (H37Rv+R848+IFN- γ vs H37Rv+IFN- γ , $p=0,001$). IL-23 veniva indotta in maniera significativa da H37Rv da solo ($p=0,005$) e la sua produzione era solo debolmente aumentata dalla combinazione di H37Rv con R848, diversamente da quanto avveniva per IL-12. Il pretrattamento con IFN- γ aumentava la produzione di IL-23 (H37Rv+IFN- γ vs H37Rv, $p=0,001$) senza che ci fosse un incremento rispetto alla stimolazione in associazione con R848. IL-10, come IL-23, veniva indotta in risposta a H37Rv da solo ($p=0,052$) e la sua produzione era solo modestamente aumentata da R848 ma ridotta dal pretrattamento con IFN- γ .

Questi risultati indicano che *Mycobacterium tuberculosis* induce in maniera efficiente la produzione di IL-23 ma è uno stimolo modesto per IL-12; comunque fornisce alle DC un segnale che agisce efficientemente in sinergia con R848 per indurre la produzione di IL-12. Considerato che le mono-DC sono più efficienti dei monociti nella produzione di IL-12 e IL-23 e dato che le mono-DC danno risposte paragonabili a quelle osservate con CD1c⁺DC purificate dal sangue, abbiamo eseguito tutti gli esperimenti successivi usando mono-DC.

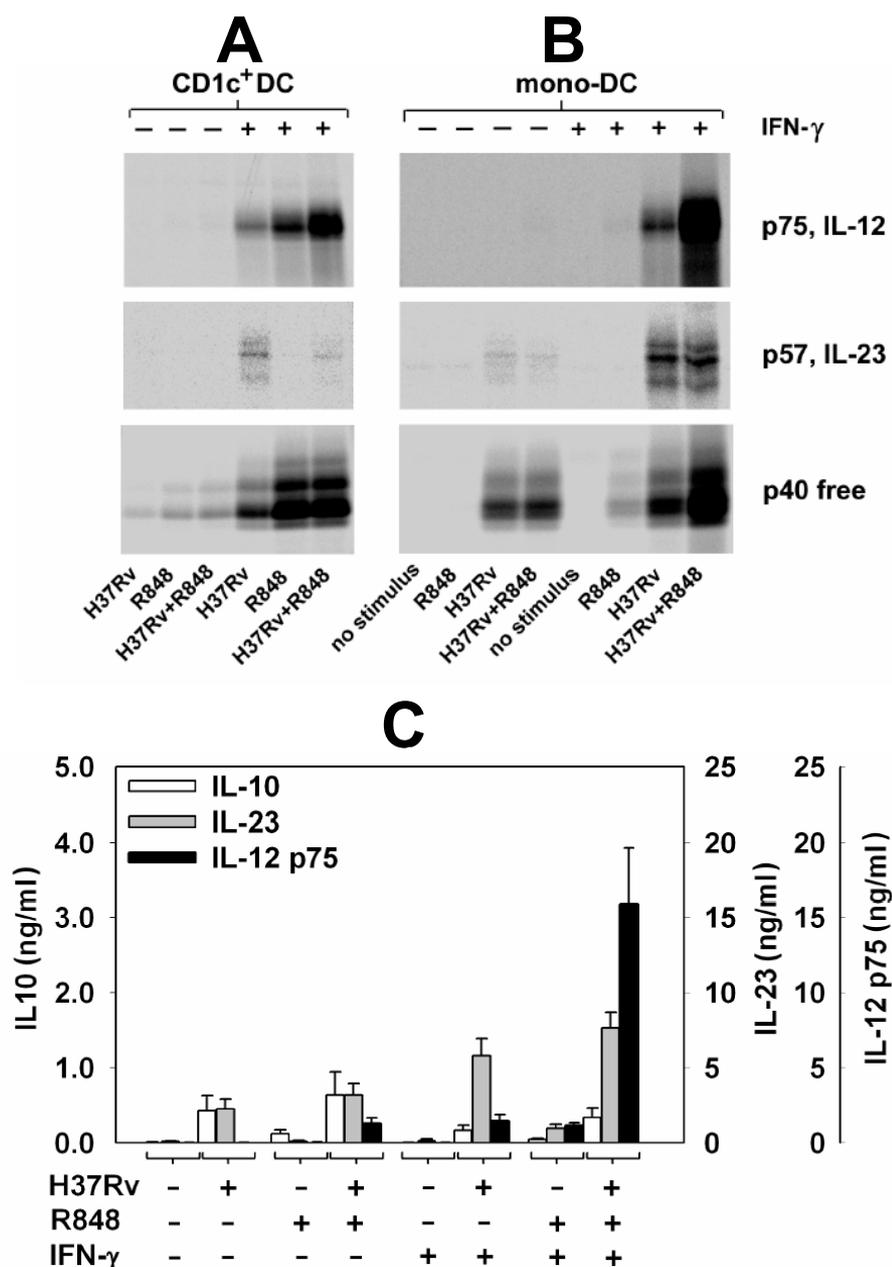


Figura 5. Diversa regolazione della produzione di IL-12 e IL-23 in cellule dendritiche CD1c⁺ e in mono-DC stimulate con H37Rv. Cellule dendritiche CD1c⁺ (A) e mono-DC (B, C) sono state pretrattate con o senza IFN- γ , marcate con [³⁵S]metionina o non marcate (C) e stimulate con H37Rv da solo o in associazione con R848. Dopo 18 ore i sopranatanti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti IL-12p35, anti IL-23p19 o anti IL12/23p40 e analizzati con SDS-PAGE (A e B) o valutati mediante test ELISA (C) per determinare la concentrazione di IL-12p75 (istogrammi neri), IL-23 (istogrammi grigi) e IL-10 (istogrammi chiari). In (A) sono stati raggruppati i sopranatanti provenienti da cellule di tre diversi donatori; i risultati in (B) sono rappresentativi di 6 diversi esperimenti; i dati riportati in (C) sono i valori medi \pm SE ottenuti da mono-DC di 20 diversi donatori

Il ligando per NOD2 associato al ligando per TLR2 mima l'induzione di IL-12 e IL-23 da parte del *Mycobacterium tuberculosis*

E' già stato riportato che le DC riconoscono *Mycobacterium tuberculosis* principalmente attraverso TLR2, TLR9, NOD2 e probabilmente TLR4 (Bafica *et al.*, 2005; Ferwerda *et al.*, 2005). Considerato che mono-DC umane non esprimono livelli funzionali di TLR9, abbiamo valutato se l'associazione del ligando per il NOD2 (MDP) con ligandi per TLR2 poteva mimare la stimolazione osservata con *Mycobacterium tuberculosis*. MDP associato a Pam2C (ligando per TLR2/6) (Figura 6.A) o assieme a Pam3C (ligando per TLR1/2) (Figura 6.B) induceva produzione di IL-23, IL-12p75 e p40 libera in mono-DC pretrattate con IFN- γ . Il trattamento con ogni stimolo da solo non induceva IL-23 e induceva livelli scarsamente rilevabili di IL-12p75 e p40. La combinazione di MDP con R848 induceva quantità maggiori di IL-12p75 ma quantità minori di IL-23 rispetto alla combinazione di MDP con Pam2C o Pam3C che inducevano preferenzialmente IL-23. Se Pam2C e Pam3C erano associati a R848 aumentavano modestamente la produzione di IL-12 ma non quella di IL-23. Quando MDP + Pam2C oppure MDP + Pam3C erano associate a R848 (Figura 6.A e 6.B rispettivamente) aumentava ulteriormente IL-12p75 e p40 mentre IL-23 rimaneva espressa ad alti livelli con un andamento confrontabile a quello osservato in mono-DC stimulate con H37Rv e con H37Rv+R848. Questi risultati sono stati confermati da test ELISA per quantificare le citochine secrete (Figura 6.C) e da saggi QuantiGene Multiplex per misurare l'accumulo di mRNA (Figura 6.D).

Quando le mono-DC non erano pretrattate con IFN- γ non si osservava produzione di IL-12 e la produzione di IL-23 e IL-10 era molto bassa in tutte le condizioni (non mostrato).

Questi dati indicano che la combinazione di ligandi per NOD2 e TLR2 mima fortemente l'azione del *Mycobacterium tuberculosis*, che induce una notevole produzione di IL-23 e in maniera meno efficiente di IL-12.

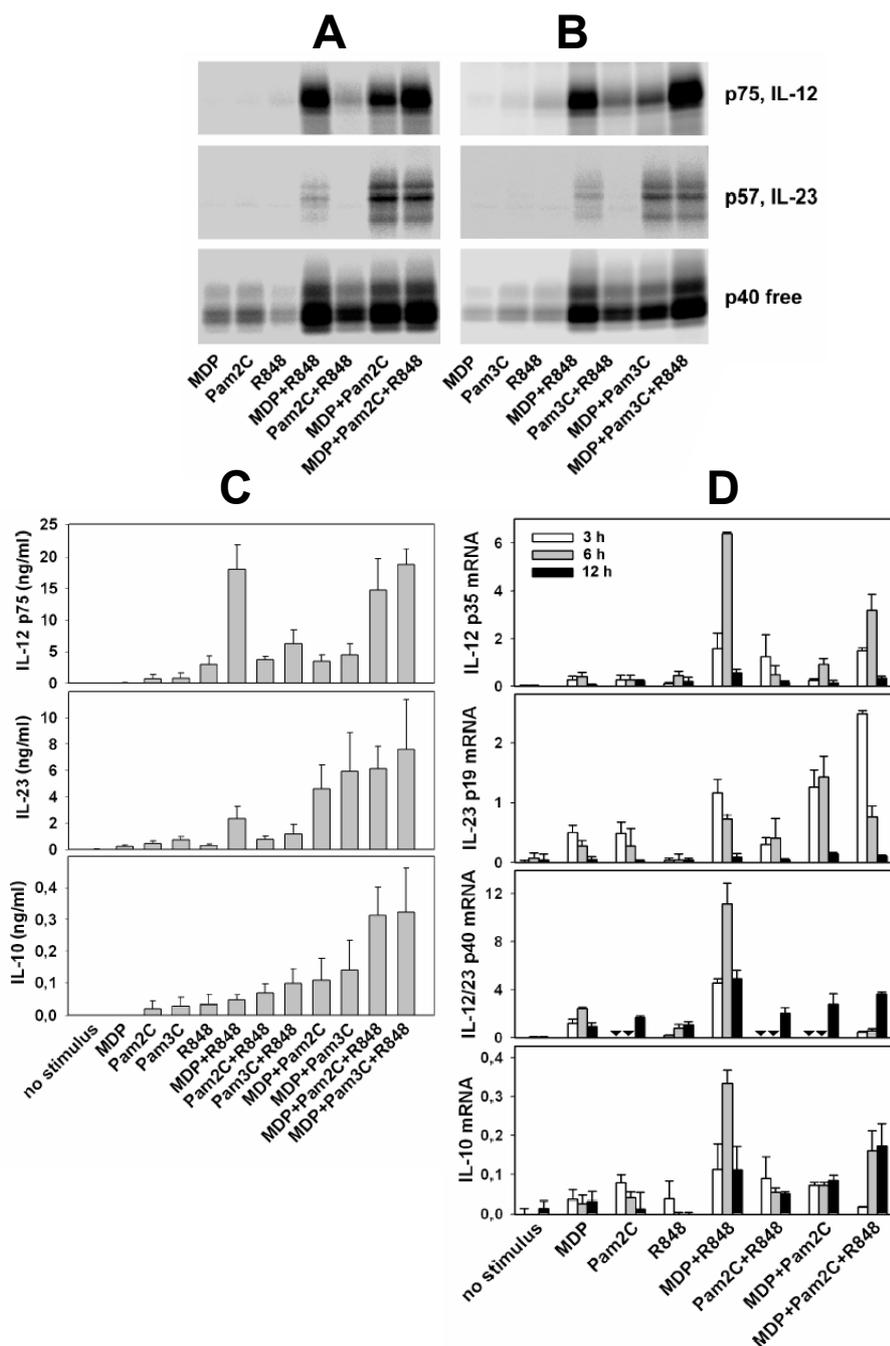


Figura 6. La combinazione di ligandi per NOD2 e per TLR2 mima l'induzione di IL-12 e IL-23 da parte del *Mycobacterium Tuberculosis*. Mono-DC pretrattate con IFN- γ , sono state marcate con [35 S] metionina (A, B) o non marcate (C, D) e stimolate con diverse combinazioni dei ligandi MDP, Pam2C e Pam3C con o senza R848. Dopo 18 ore i sopranatanti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti IL-12p35, anti IL-23p19 o anti IL-12/23p40 e analizzati con SDS-PAGE (A e B) o analizzati mediante test ELISA per la produzione di IL-12p75, IL-23 e IL-10 (C). In (D) le cellule sono state lisate a 3 ore (istogrammi chiari), 6 ore (istogrammi grigi) e a 12 ore (istogrammi neri) e l'accumulo di mRNA è stato determinato usando il saggio QuantiGene Multiplex. I risultati in (A, B) sono rappresentativi di quelli ottenuti in 3 esperimenti indipendenti con cellule derivate da 3 diversi donatori; i dati in (C) sono i valori medi \pm SE ottenuti da mono-DC derivate da tre diversi donatori. I dati riportati in (D) sono stati ottenuti con cellule di due diversi donatori e sono stati espressi come valori medi \pm SD di colture cellulari in triplicato; i campioni non fatti sono indicati con i simboli triangolari.

Il ruolo essenziale di NOD2 in risposta a H37Rv è stato confermato dalla completa assenza di produzione di IL-12, sia p75 che p40, in mono-DC pretrattate con IFN- γ ottenute da tre pazienti con morbo di Crohn (omozigoti per la mutazione *frameshift* 1007fs del gene NOD2) stimolati con H37Rv (Figura 7.A e 7.B).

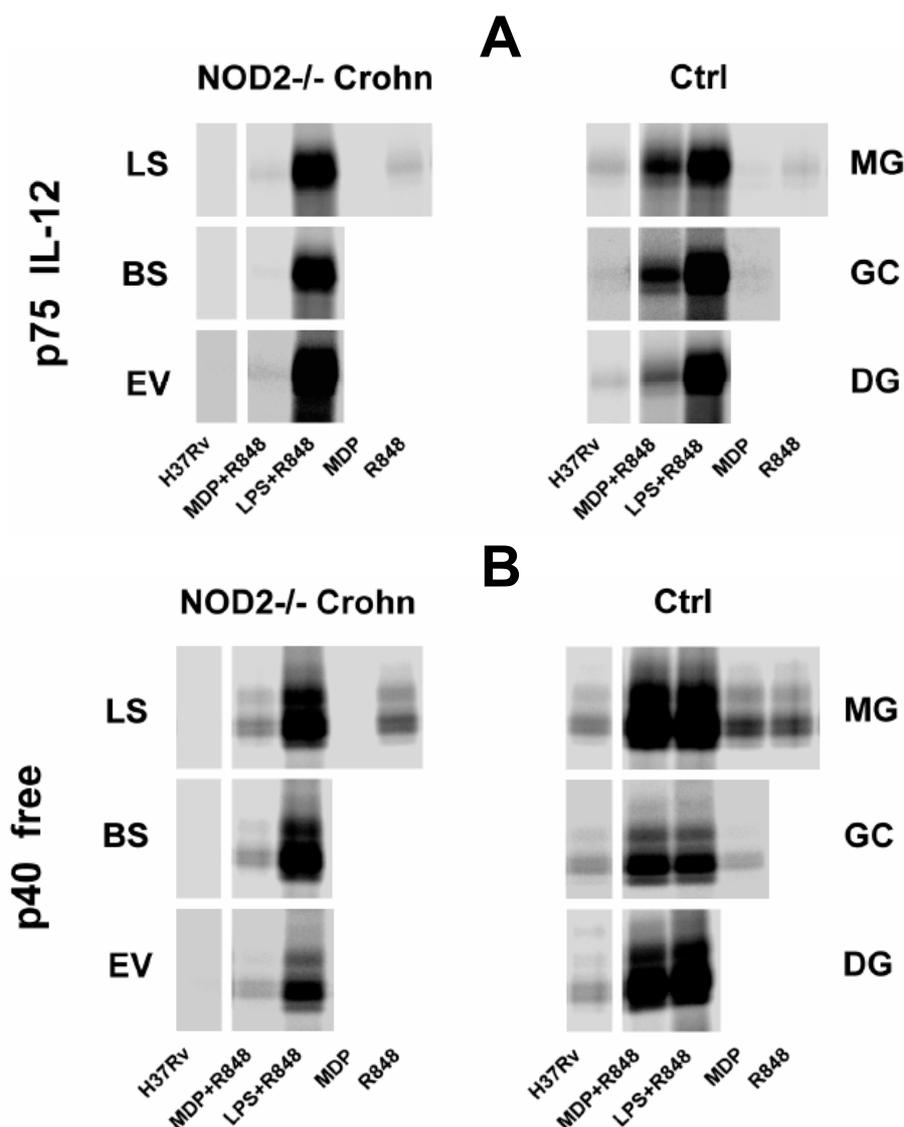


Figura 7. Assenza di produzione di IL-12p75 e p40 in mono-DC, ottenute da tre pazienti NOD2^{-/-} con morbo di Crohn, stimolate con H37Rv. Mono-DC sono state marcate con [³⁵S] metionina e stimolate con H37Rv, MDP, R848, MDP+R848 o LPS+R848. Dopo 18 ore, i soprannatanti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti IL-12p35 (A) o anti IL-12/23p40 (B) e analizzati mediante SDS-PAGE. Le mono-DC di pazienti con morbo di Crohn e di donatori di controllo analizzate per IL-12p75 (A) corrispondono alle stesse analizzate per la produzione di p40 (B).

Sebbene non siano stati identificati nel *Mycobacterium tuberculosis* ligandi per TLR7/8, il DNA del micobatterio è un ligando per il TLR9 (Bafica *et al.*, 2005) che è un recettore, espresso nelle DC di topo ma non in quelle umane, accoppiato alla proteina MyD88, con delle proprietà di segnalazione simili a quelle del TLR7/8. Dato che la combinazione del ligando del NOD2 con il ligando del TLR7/8 (R848) è più efficiente della combinazione con il ligando del TLR2 nell'indurre IL-12, i ligandi di NOD2 associati con il DNA del micobatterio possono rappresentare un forte stimolo per l'induzione di IL-12 da parte del *Mycobacterium tuberculosis* nelle DC di topo.

Lo zymosan regola in maniera diversa la produzione di IL-12 e IL-23

Quando mono-DC venivano stimulate con alte concentrazioni di zymosan (200 µg/ml), producevano IL-23, scarse quantità di p40 libera e nessuna produzione di IL-12p75, come si osserva nell'esperimento di immunoprecipitazione (Figura 8.A). Quantità minori di zymosan come 10 µg/ml inducevano solo la produzione di p40 libera. L'associazione di zymosan con R848 induceva IL-12p75 e aumentava la quantità di IL-23 e di p40 libera. Quando lo zymosan a 10 µg/ml era associato a R848 induceva una quantità di IL-12p75 molto più alta di quella prodotta dallo zymosan a 200 µg/ml associato a R848, mentre l'opposto si osservava con IL-23. Il pretrattamento delle DC con IFN- γ aumentava la produzione di IL-12p75, IL-23 e p40 libera in risposta allo zymosan sia in presenza che in assenza di R848. Inoltre la quantità di IL-12p75 indotta da 10 µg/ml di zymosan era notevolmente più alta di quella indotta da 200 µg/ml di zymosan.

Le citochine dosate mediante test ELISA (Figura 8.B) hanno confermato che lo zymosan induceva la produzione di IL-12p75 solo quando usato in associazione con R848 o quando le DC erano preattivate con IFN- γ . La quantità di IL-12p75 indotta dallo zymosan a 10 µg/ml era significativamente più alta di quella indotta dallo zymosan a 200 µg/ml, sia quando associato con R848 ($p=0,012$), sia quando le cellule erano preattivate con IFN- γ

($p=0,010$). La massima produzione di IL-12 si osservava quando le DC, preattivate con IFN- γ , erano stimulate con R848 assieme a basse concentrazioni di zymosan (zymosan 10 $\mu\text{g/ml}$ vs zymosan 200 $\mu\text{g/ml}$, $p=0,011$).

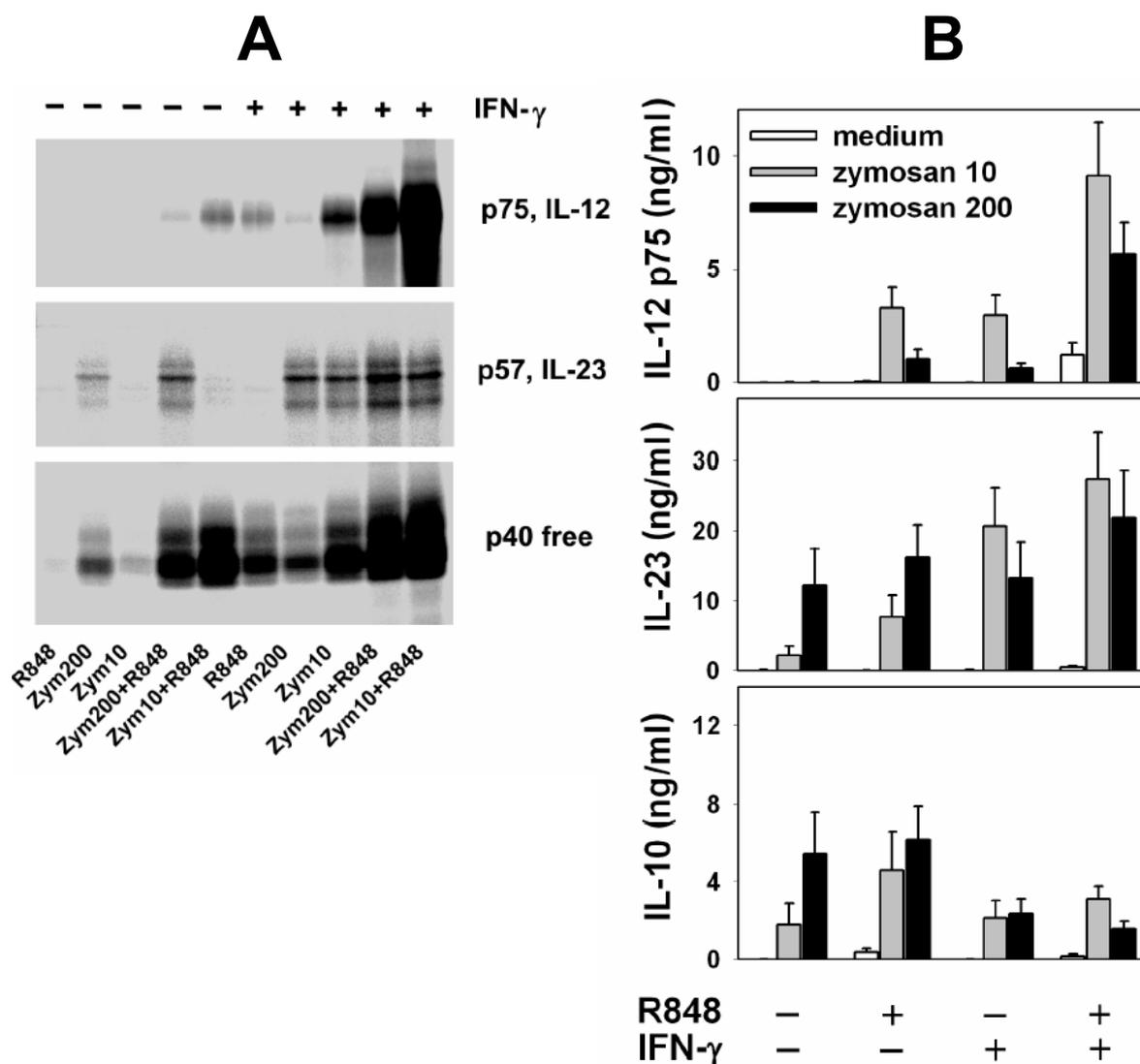


Figura 8. Diversa regolazione della produzione di IL-12 e IL-23 in mono-DC stimulate con zymosan. Mono-DC pretrattate con o senza IFN- γ , marcate con [^{35}S] metionina (A) o non marcate (B) sono state stimulate con 10 $\mu\text{g/ml}$ o 200 $\mu\text{g/ml}$ di zymosan da solo o associato con R848. Dopo 18 ore i sopranatanti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti IL-12p35, anti IL-23p19, anti IL-12/23p40 e analizzati mediante SDS-PAGE (A) o valutati mediante test ELISA per determinare la produzione di IL-12p75, IL-23 e IL-10 (B). I risultati in (A) sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti; i dati riportati in (B) sono i valori medi \pm SE ottenuti da mono-DC di 10 diversi donatori.

Diversamente da quanto osservato per IL-12, lo zymosan da solo a 200 µg/ml induceva alti livelli di IL-23 e questi livelli non erano modificati significativamente da R848 o dalla preattivazione con IFN-γ. Lo zymosan a 10 µg/ml induceva livelli molto più bassi di IL-23 rispetto allo zymosan a 200 µg/ml (p=0,026) ma questi livelli venivano aumentati in maniera significativa dalla costimolazione con R848 (p=0,010) o dalla preattivazione con IFN-γ (p=0,002). In mono-DC la produzione di IL-10 era indotta dallo zymosan da solo a 200 µg/ml o dallo zymosan a 10 µg/ml associato con R848; la produzione indotta da alte concentrazioni di zymosan veniva ridotta quando le mono-DC stimulate con R848 (p=0,016) o senza (p=0,047) erano preattivate con IFN-γ.

Lo zymosan è quindi un potente induttore di IL-23 e di IL-10 in maniera dose-dipendente. La preattivazione delle DC con IFN-γ inibiva la produzione di IL-10 indotta dallo zymosan, mentre non aveva effetto sulla produzione di IL-23 indotta da alte dosi di zymosan. Diversamente da IL-23, in mono-DC preattivate con IFN-γ, solo lo zymosan usato a basse concentrazioni induceva debolmente la produzione di IL-12. Comunque lo zymosan sinergizzava fortemente con R848 per indurre IL-12 e questo effetto era maggiore a basse concentrazioni di zymosan e veniva amplificato quando le mono-DC erano preattivate con IFN-γ.

L'associazione di ligandi per dectin-1 e TLR2 mima l'induzione di IL-12 da parte dello zymosan

Lo zymosan induce stimolazione delle mono-DC principalmente attraverso due PRRs: TLR2 e dectin-1 (recettore per il β-glucano) (Gantner *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2003). Per accertare il contributo relativo di questi recettori è stata valutata la capacità di ligandi purificati per questi recettori di mimare l'induzione della produzione di IL-12 e IL-23 indotta dallo zymosan. Come si osserva da esperimenti di immunoprecipitazione (Figura 9.A) e da test ELISA (Figura 9.B) il β-glucano da solo induceva produzione di IL-23 e di p40 libera ma non di IL-12p75 in maniera analoga a quanto osservato in mono-DC

stimolate con zymosan. La produzione di IL-12 si osservava solo quando le mono-DC erano stimulate con β -glucano associato a R848, condizione nella quale era aumentata anche la produzione di IL-23 e di p40 libera. La stimolazione con β -glucano induceva anche la produzione di IL-10, come già riportato da altri (Rogers *et al.*, 2005), e questa produzione era aumentata da R848 (Figura 9.B). La preattivazione con IFN- γ aumentava in maniera significativa la produzione di IL-12p75 indotta dal β -glucano ($p=0,018$), come si osservava con lo zymosan. La preattivazione con IFN- γ inibiva invece drasticamente l'espressione di IL-23 e di IL-10 indotta dal β -glucano. La produzione di IL-10 era significativamente più bassa ($p<0,02$) quando le mono-DC preattivate con IFN- γ erano stimulate con β -glucano da solo o in combinazione con R848 (Figura 9.B) oppure con Pam2C.

La produzione di IL-23 indotta da β -glucano era significativamente più bassa ($p=0,02$) quando le cellule provenienti da numerosi donatori erano preattivate con IFN- γ (Figura 9.C). L'espressione del dectin-1 valutata mediante immunofluorescenza (non mostrato) non differiva tra cellule preattivate o meno con IFN- γ , indicando che la ridotta produzione di IL-23 e IL-10 non dipendeva da una diminuita espressione del recettore. Inoltre quando le mono-DC erano stimulate con β -glucano assieme a Pam2C (ligando per TLR2), che è l'altro principale recettore coinvolto nel riconoscimento dello zymosan, non veniva più inibita la produzione di IL-23 che si osservava dopo la preattivazione con IFN- γ (Figura 9.D).

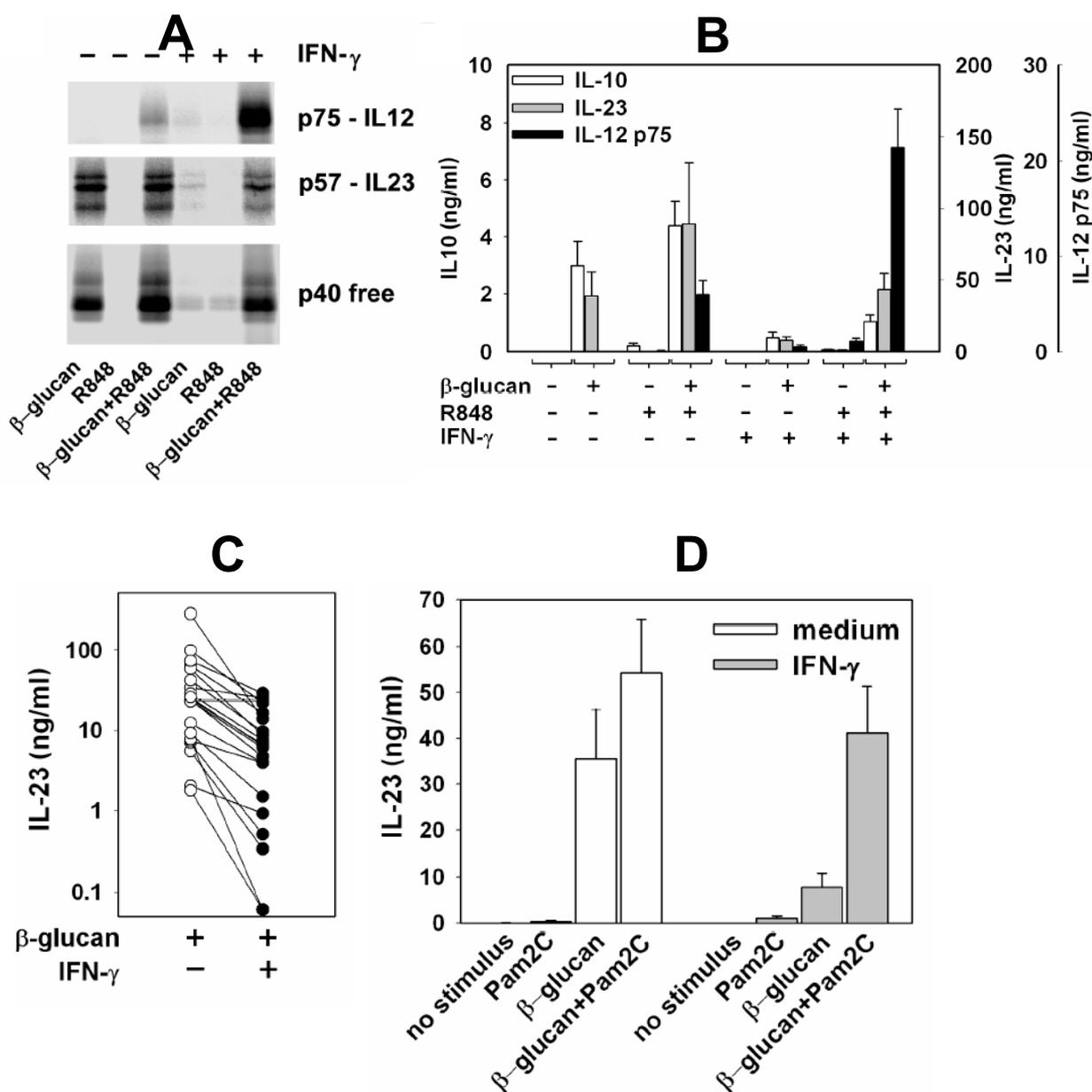


Figura 9. Ruolo di dectin-1 e TLR2 nella produzione di IL-12 e IL-23 da parte di mono-DC. Mono-DC pretrattate con o senza IFN- γ , marcate con [35 S]metionina (A) o senza (B, D) sono state stimolate con β -glucano, Pam2C, o con una combinazione di β -glucano+Pam2C, con o senza R848. Dopo 18 ore i sopranatanti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti IL-12p35, anti IL-23p19, anti IL-12/23p40 e analizzati mediante SDS-PAGE (A) e valutati mediante test ELISA per la produzione di IL-12p75, IL-23 e IL-10 (B, D). I risultati in (A) sono rappresentativi di 4 esperimenti indipendenti; i dati riportati in (B) sono i valori medi \pm SE ottenuti da mono-DC di 18 diversi donatori. I risultati in (C) rappresentano i livelli individuali di IL-23 ottenuti da mono-DC di 21 donatori diversi; i dati riportati in (D) sono i valori medi \pm SE ottenuti da 5 esperimenti.

I dati di accumulo di mRNA sono strettamente correlati con l'espressione delle proteine (Figura 10.).

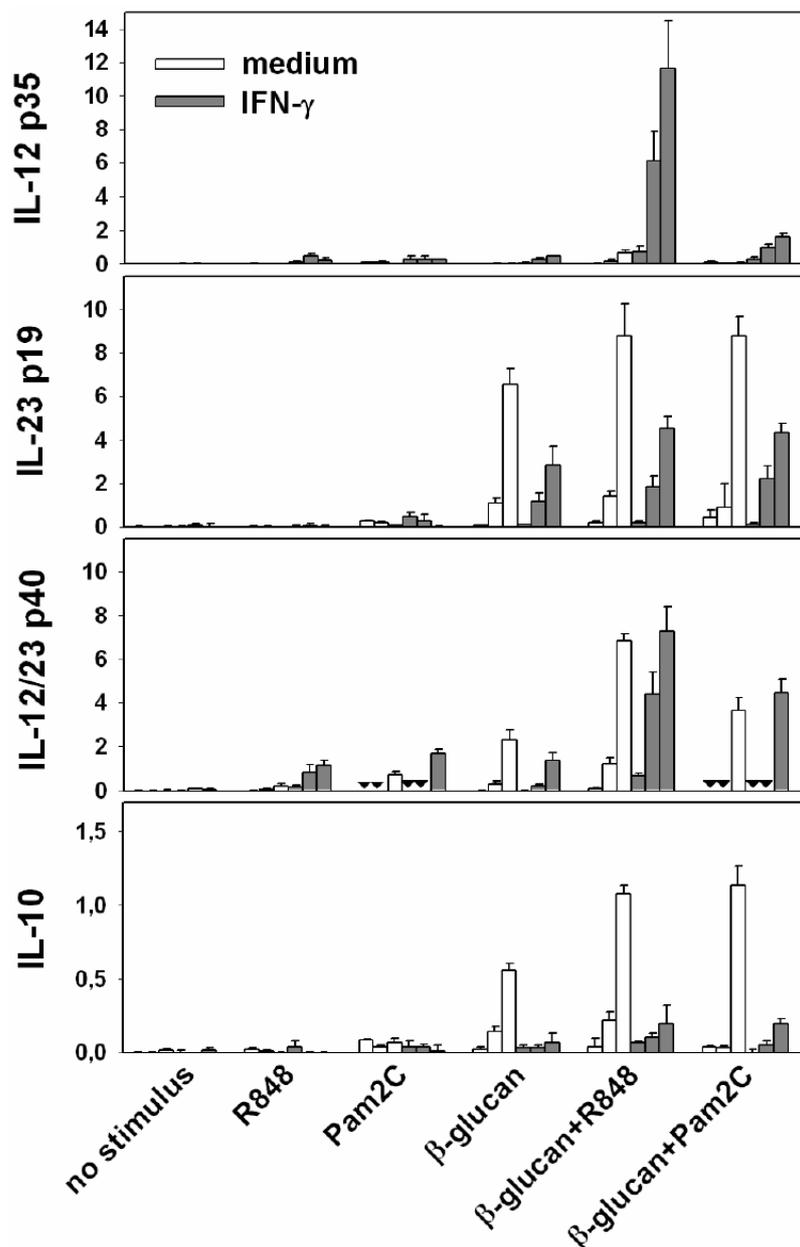


Figura 10. Livelli di espressione di mRNA dei geni che codificano per IL-12p35, IL-12/23p40 e IL-10 in mono-DC pretrattate o meno con IFN- γ e stimolate con β -glucano, R848 e Pam2C da soli o in associazione. L'accumulo di mRNA è stato determinato usando il saggio QuantiGene Multiplex. I dati riportati sono i valori medi \pm SD ottenuti dalle cellule di tre diversi donatori, lisate a 3 ore (colonna a sinistra della tripletta), a 6 ore (colonna in mezzo) e a 12 ore (colonna a destra); i campioni non fatti sono indicati con i simboli triangolari.

Sono stati valutati gli RNA messaggeri del gene che codifica per la catena p40 comune a IL-12 e IL-23, accumulati dopo la stimolazione con ligandi per PRRs aggiunti singolarmente o in combinazione. Il β -glucano induceva un notevole accumulo dei trascritti di p19 di IL-23 e di IL-10 e questo accumulo veniva ulteriormente aumentato quando R848 o Pam2C erano associati al β -glucano; la preattivazione con IFN- γ delle mono-DC diminuiva l'accumulo di mRNA sia di p19 di IL-23, che di IL-10, in risposta a questi ligandi. L'accumulo dei trascritti di IL-12p35 era strettamente dipendente dalla preattivazione con IFN- γ , con massimi livelli quando le mono-DC preattivate con IFN- γ erano stimulate con una combinazione di β -glucano e R848. I dati di accumulo di mRNA mostrano che l'induzione di IL-12 e IL-23 si riflette nell'accumulo dei trascritti di IL-12p35 e IL-12p19, ma non di IL-12/23p40.

Questi risultati mostrano che diversamente da ciò che avviene con alte dosi di zymosan, la stimolazione con β -glucano da solo induce produzione di IL-23 in cellule non preattivate mentre induce una scarsa produzione in mono-DC preattivate con IFN- γ . L'associazione di β -glucano con Pam2C aumenta la produzione di IL-23 nella maggior parte dei donatori, quando le mono-DC non sono preattivate, e abolisce in maniera significativa l'inibizione della produzione di IL-23 che si osserva quando le cellule sono preattivate con IFN- γ . Quindi la combinazione di ligandi per dectin1 e TLR2 induce un'elevata produzione di IL-23 indipendentemente dalla preattivazione delle cellule con IFN- γ , come avviene con alte dosi di zymosan.

I ligandi per TLR2 inibiscono la produzione di IL-12 da mono-DC indotta dalla combinazione di altri ligandi per PRRs

Quando mono-DC, preattivate o meno con IFN- γ , erano trattate con una combinazione di β -glucano e R848 a cui era associato anche il Pam2C, la produzione di IL-12p75 veniva drasticamente inibita, IL-12p40 veniva solo minimamente diminuita mentre aumentava in maniera consistente IL-23 (Figura 11.A).

Per studiare gli effetti inibitori dei ligandi per TLR2 sulla produzione di IL-12p75 le mono-DC provenienti da diversi donatori sono state incubate con LPS, β -glucano o basse dosi di zymosan associati a R848 (combinazioni che inducono una notevole produzione di IL-12p75) in presenza o assenza di Pam2C (Figura 11.B). Pam2C inibiva notevolmente la produzione di IL-12p75 indotta da zymosan e R848 ($p=0,006$) o da β -glucano e R848 ($p=0,007$), mentre la produzione di IL-12p75, indotta da LPS e R848, veniva modestamente ridotta ($p=0,012$). IL-10, al contrario, veniva aumentata (zymosan+R848, $p=0,019$ o β -glucano+ R848, $p=0,002$) o restava invariata (LPS+R848) dal trattamento con Pam2C. La produzione di IL-12p75 indotta da LPS+R848 era scarsamente sensibile all'inibizione da parte di ligandi per TLR2, come confermato dal fatto che erano necessari 50ng/ml di Pam2C per avere un'inibizione del 75% della produzione di IL-12p75 indotta da LPS+R848, mentre 5ng/ml e 0,5ng/ml erano sufficienti per avere più del 75% di inibizione della produzione di IL-12p75 indotta rispettivamente da β -glucano+R848 e da zymosan+R848 (Figura 11.C). I tre ligandi sintetici MALP-2, Pam2C (entrambi ligandi per TLR2/TLR6) e Pam3C (ligando per TLR2/TLR1) mostravano tutti una forte capacità dose-dipendente di inibire la produzione di IL-12p75 indotta da zymosan+R848 o da β -glucano+R848. MALP2 e Pam2C erano comunque più potenti di Pam3C (Figura 11.D)

La capacità dei ligandi per TLR2 di inibire la produzione di IL-12p75 ma non quella di IL-23 indotta da β -glucano+R848 potrebbe spiegare la correlazione inversa tra dose di stimolo e produzione di IL-12p75 osservata in cellule stimulate con lo zymosan. Questa correlazione inversa, potrebbe indicare che a diverse concentrazioni di zymosan corrisponde un diverso contributo dei ligandi per dectin-1 e per TLR2. La produzione dose-dipendente di IL-23 potrebbe essere attribuita alla presenza nello zymosan di β -glucano, ligando per dectin-1, che è uno stimolo efficace per indurre la produzione di IL-23 che viene aumentata anche dalla combinazione con ligandi per TLR2. L'attività inibitoria sulla produzione di IL-12, ma non di IL-23, è dovuta ai ligandi per TLR2 presenti anch'essi nello zymosan che potrebbero essere responsabili della diminuita produzione di IL-12 quando alte dosi di zymosan vengono usate in associazione con R848.

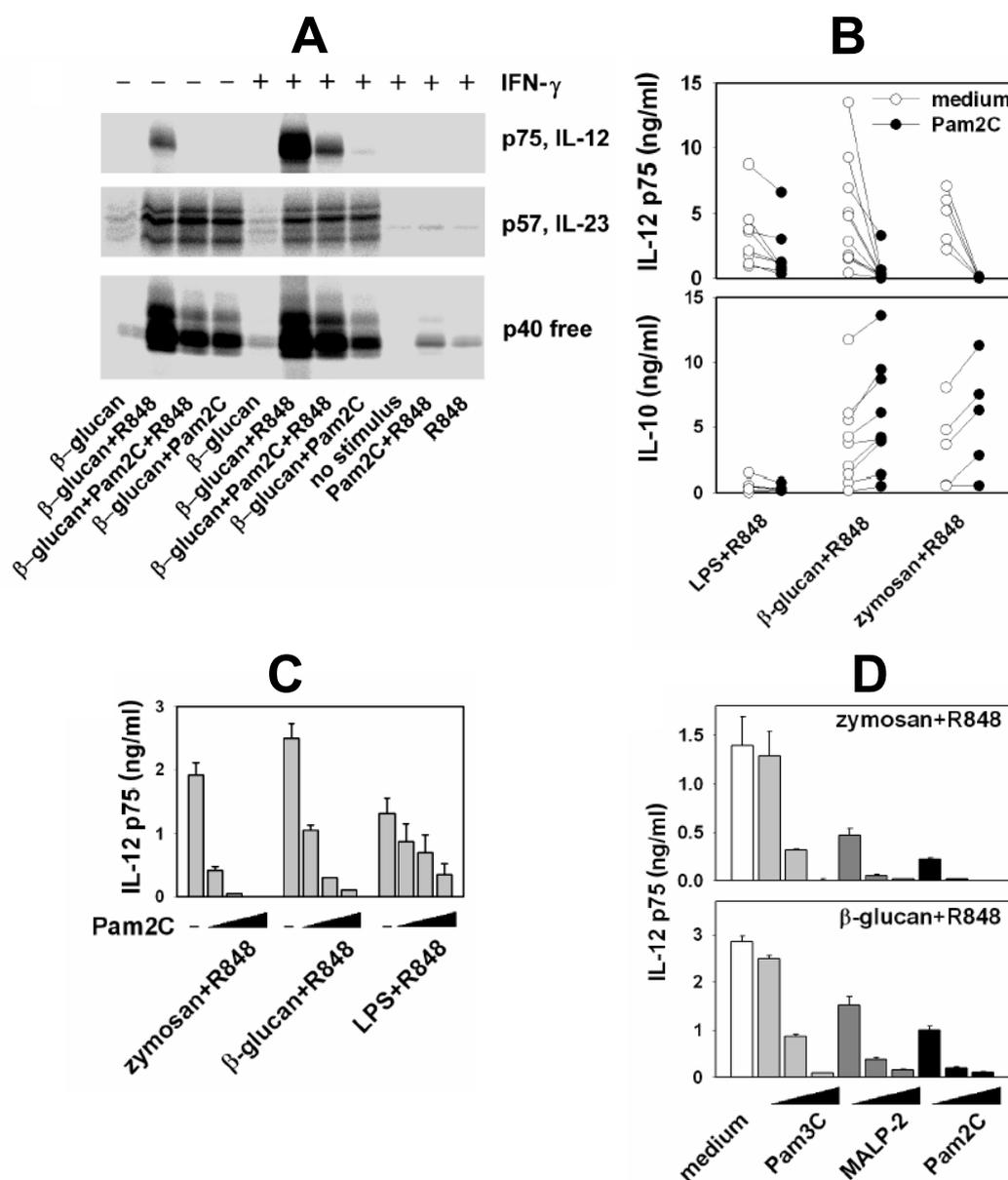


Figura 11. Ligandi per TLR2 inibiscono la produzione di IL-12p75. (A) Mono-DC pretrattate o meno con IFN- γ , sono state marcate con [35 S]metionina e stimulate con β -glucano, Pam2C, R848 e loro associazioni. Dopo 18 ore i soprannatanti sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti IL-12p35, anti IL-23p19 o anti IL-12/23p40 e analizzati con SDS-PAGE. (B) Mono-DC sono state stimulate con β -glucano, zymosan o LPS, associati a R848, in presenza o assenza di Pam2C. Dopo 18 ore i soprannatanti sono stati testati per la produzione di IL-12p75 e IL-10 mediante test ELISA (ogni simbolo rappresenta un singolo donatore). (C) Mono-DC sono state stimulate come indicato in (A) in presenza o assenza di Pam2C (0,5, 5 e 50ng/ml) e IL12p75 è stata dosata mediante test ELISA (i dati riportati sono i valori medi \pm SD ottenuti da colture in triplicato). (D) I soprannatanti di mono-DC stimulate con zymosan+R848 o β -glucano+R848 con o senza Pam3C (2, 20 e 200ng/ml), MALP-2 (1,10 e 100ng/ml) o Pam2C (0,5, 5 e 50ng/ml) sono stati analizzati mediante test ELISA per la produzione di IL-12p75. I dati riportati sono i valori medi \pm SD ottenuti da colture in triplicato.

IL-10 è indotta da ligandi per TLR2 ma non è responsabile dell'inibizione della produzione di IL-12p75

La produzione di IL-10 e l'accumulo dei trascritti di IL-10 in mono-DC è indotta sia dallo zymosan che dal β -glucano, con un aumento dei livelli di produzione dopo la costimolazione con R848 o con Pam2C. Per valutare se IL-10 autocrina fosse responsabile dell'inibizione della produzione di IL-12p75 e di IL-23, le mono-DC sono state stimulate con zymosan 10 μ g/ml+R848 o β -glucano+R848 in presenza o meno di anticorpi neutralizzanti IL-10 (Figura 12.) e/o di IL-10 ricombinante esogena (non mostrato). Sia IL-23 che IL-12p75 venivano inibite da IL-10 esogena (non mostrato) e da quella autocrina, come dimostrato dall'aumento della produzione di IL-23 e di IL-12p75 in presenza di anticorpi neutralizzanti IL-10. L'effetto inibitorio di Pam2C sulla produzione di IL-12p75 non veniva modificato dagli anticorpi neutralizzanti IL-10 indicando così che IL-10 non è responsabile dell'inibizione. Questo dato è supportato inoltre dal fatto che sebbene IL-10 sia in grado di bloccare la produzione di IL-12 e quella di IL-23, Pam2C incrementava la produzione di IL-23 mentre sopprimeva la produzione di IL-12. Anche l'anticorpo neutralizzante TGF- β , da solo o insieme all'anticorpo anti IL-10, non preveniva l'inibizione da parte di Pam2C sulla produzione di IL-12p75 (non mostrato).

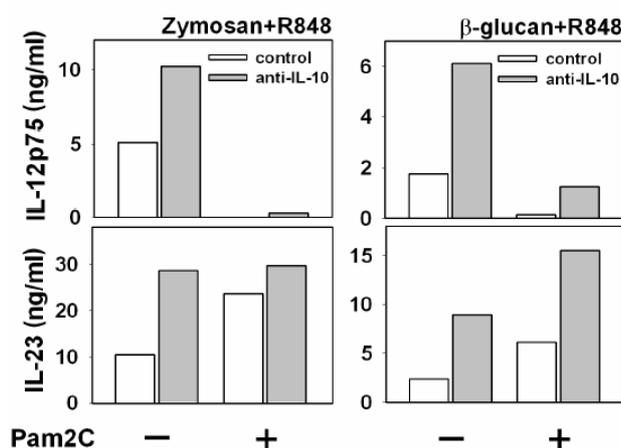


Figura 12. Anticorpi neutralizzanti IL-10 non modificano l'inibizione di Pam2C sulla produzione di IL-12p75. Mono-DC sono state stimulate con zymosan 10 μ g/ml+R848 o con β -glucano 0,1 μ g/ml+R848 in assenza (istogrammi chiari) o presenza (istogrammi grigi) di anticorpi 19F1, neutralizzanti IL-10 (30 μ g/ml), con o senza Pam2C (50ng/ml). IL-12p75 e IL-23 prodotte dalle mono-DC sono state dosate mediante test ELISA. I dati riportati sono i valori medi di colture in duplicato di un esperimento e sono rappresentativi di 6 diversi esperimenti con risultati simili.

I sopranatanti di mono-DC stimulate con PAMPs inducono cellule T CD4⁺ naive umane a produrre IL-17 e IFN- γ

Abbiamo valutato se i sopranatanti di mono-DC stimulate nelle condizioni che portano alla massima produzione di IL-23 erano in grado di indurre la produzione di IL-17 in cellule T CD4⁺ naive umane stimulate con anti CD3 e anti CD28. I sopranatanti testati, provenienti da cellule trattate con zymosan, β -glucano e LPS+R848, contenevano circa la stessa concentrazione di IL-23. Diversamente da IL-23, IL-12 non era rilevabile nei sopranatanti di cellule stimulate con il β -glucano; i livelli di IL-12 invece erano più alti nei sopranatanti con LPS+R848 ed erano bassi nei sopranatanti con zymosan (Figura 13.A).

L'induzione della produzione di IFN- γ da cellule T CD4⁺ naive correla con la quantità di IL-12 presente nei sopranatanti, ma solo i sopranatanti di mono-DC stimulate con zymosan e β -glucano e non con LPS+R848, inducevano la produzione di IL-17 sebbene tutti e tre i sopranatanti contenessero IL-23. L'anticorpo 20C2, che blocca l'attività biologica di IL-12 ma non di IL-23, inibiva completamente la produzione di IFN- γ ma non quella di IL-17, mentre l'anticorpo C8.6 (anticorpo anti IL-12p40) che inibisce sia IL-12 che IL-23, bloccava completamente la produzione di IFN- γ ma solo per metà la produzione di IL-17 ($p=0,0002$ e $p=0,013$ per zymosan e β -glucano, rispettivamente) (Figura 13.B). Abbiamo preso quindi in considerazione TGF- β e IL-6 che sono due citochine essenziali per la produzione di IL-17 nel topo (Veldhoen *et al.*, 2006). Gli anticorpi anti TGF- β e anti IL-6, singolarmente, inibivano in parte la produzione di IL-17 e in combinazione inducevano una notevole inibizione di IL-17 prodotta, mentre questi anticorpi, da soli o in combinazione portavano ad un aumento della produzione di IFN- γ (Figura 13.C). L'analisi della concentrazione di IL-6 ha rilevato che questa citochina è presente in tutti e tre i sopranatanti, come la citochina IL-23. Nei sopranatanti stimolati con zymosan e β -glucano è stata inoltre rilevata IL-1 β , che è una citochina potenzialmente coinvolta nell'induzione di IL-17 da cellule T CD4⁺ umane (Van Beelen *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007). IL-1 β era invece presente a livelli minimi nei sopranatanti di mono-DC stimulate con LPS+R848 (Figura 13.A).

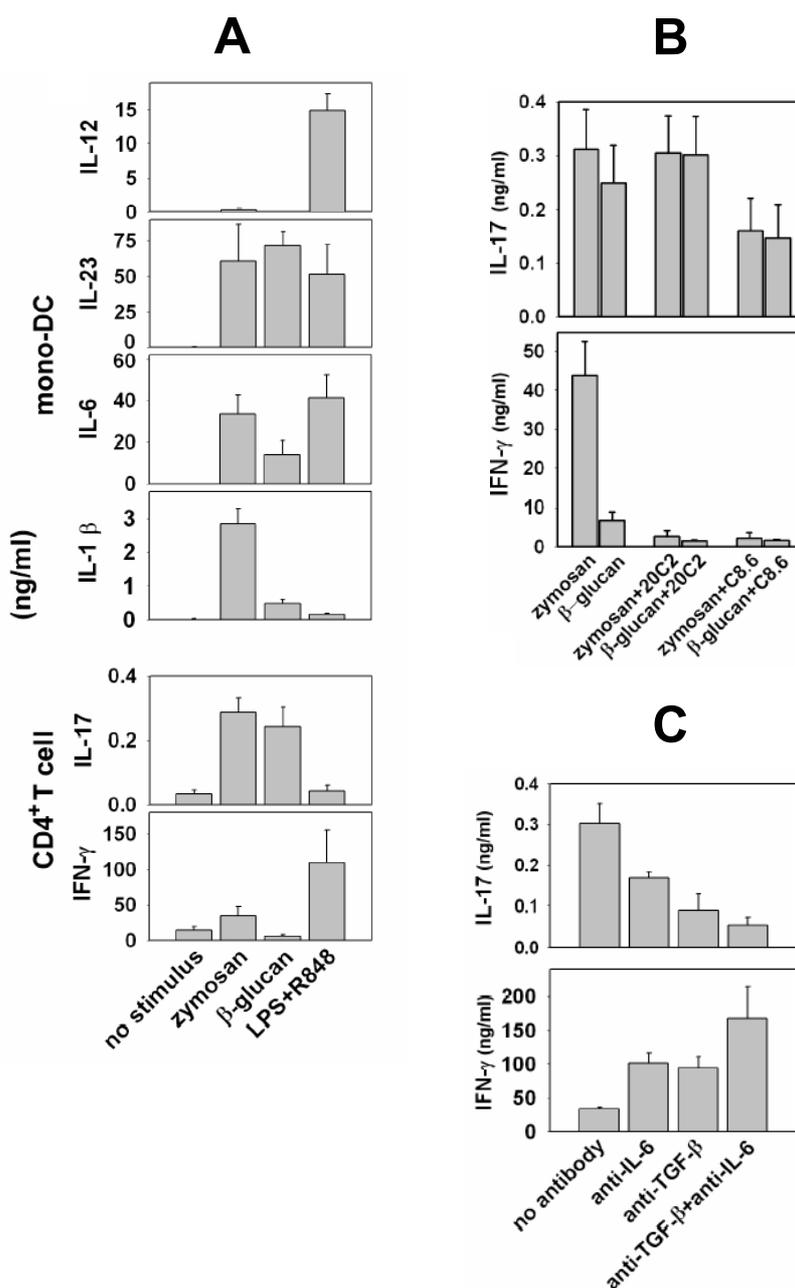


Figura 13. Induzione di IL-17 e IFN- γ in cellule T CD4⁺ da parte dei soprinatanti di mono-DC. I soprinatanti di mono-DC stimulate con stimoli diversi sono stati usati per indurre la produzione di IL-17 e IFN- γ da linfociti T CD4⁺ CD45RO⁻ stimolati con anti CD3 e anti CD28. (A) I soprinatanti di mono-DC preattivate con IFN- γ e stimulate con zymosan (200 μ g/ml) o LPS (1 μ g/ml)+R848 o non preattivate e stimulate con β -glucano (10 μ g/ml) sono stati dosati mediante test ELISA per la produzione di IL-12, IL-23, IL-6 e IL-1 β e per la capacit  di indurre IL-17 e IFN- γ in cellule T CD4⁺ naive (i dati riportati sono i valori medi \pm SE ottenuti da 10 esperimenti). (B) Valutazione mediante test ELISA della produzione di IL-17 e di IFN- γ in cellule T CD4⁺ in presenza di soprinatanti di mono-DC stimulate con zymosan o β -glucano in presenza o assenza di anticorpi neutralizzanti IL-12p75 (20C2) o p40 (C8.6). I dati riportati sono i valori medi \pm SE ottenuti da 7 esperimenti. (C) Effetto degli anticorpi neutralizzanti TGF- β e IL-6 o di una miscela di entrambi, sulla produzione di IL-17 e IFN- γ (misurata mediante test ELISA) da cellule T naive coltivate con il soprinatante di mono-DC stimulate con lo zymosan. I dati riportati sono i valori medi \pm SD ottenuti da colture in triplicato; risultati simili sono stati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

Se IL-1 β veniva usata assieme a IL-23 ricombinante o veniva aggiunta IL-1 β ai sopranatanti di mono-DC stimulate con LPS+R848 (dai quali era stata tolta IL-12 attraverso cromatografia per affinità con biglie coniugate ad anticorpi anti IL-12p35), ripristinava la produzione di IL-17 da cellule T CD4⁺ *naive* (Figura 14.).

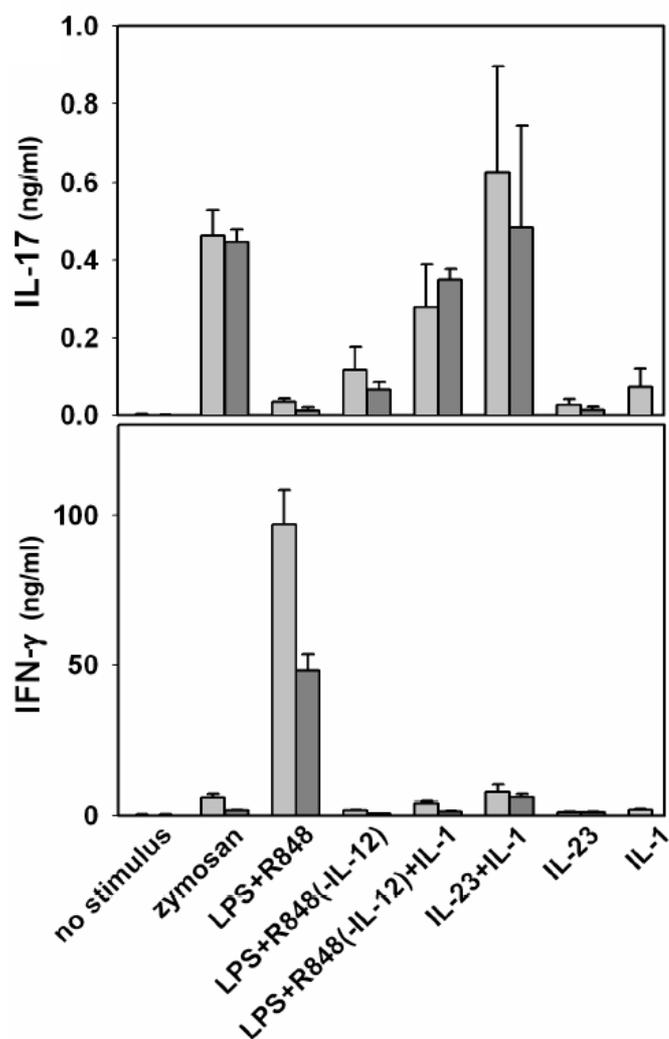


Figura 14. Effetto di IL-1 β nell'induzione di cellule Th17. Cellule T CD4⁺ *naive* sono state coltivate in presenza di sopranatanti di mono-DC stimulate con zymosan, LPS+R848, LPS+R848 a cui era stata tolta IL-12 con o senza IL-1 β ; IL-1 β (10ng/ml), IL-23 o IL-1 β +IL-23. I sopranatanti di mono-DC sono stati diluiti fino ad ottenere una concentrazione di IL-23 di 15ng/ml (istogrammi grigio chiaro) o 1,5 ng/ml (istogrammi grigio scuro). I dati riportati sono i valori medi \pm SD ottenuti da colture in triplicato; risultati simili sono stati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti.

Anche l'antagonista del recettore per IL-1 β inibiva la produzione di IL-17 indotta dai sopranatanti (non mostrato). Sebbene IL-23, TGF- β e IL-6 sembrano avere un ruolo nell'induzione di IL-17, la citochina IL-1 β , in combinazione con uno o più fattori, è essenziale nell'indurre la produzione di IL-17 e nel determinare la diversa capacità dei sopranatanti di mono-DC attivate di stimolare la produzione di IL-17 in cellule T CD4⁺ *naive* umane.

DISCUSSIONE

IL-12 è una citochina eterodimerica prodotta da cellule dell'immunità innata, in particolare da cellule dendritiche e macrofagi che vengono stimolati attraverso i PRRs e interagiscono con cellule NK o con cellule T che sono state attivate dall'antigene (Trinchieri, 2003). La stimolazione individuale di un PRR, che induce la produzione di una notevole quantità di catena p40 libera, non è però sufficiente per avere una produzione ottimale dell'eterodimero IL-12 (D'Andrea *et al.*, 1992; Gautier *et al.*, 2005). Oltre alla stimolazione del singolo PRR per avere un'efficiente produzione dell'eterodimero IL-12 è necessaria la presenza di citochine (come IFN- γ e IL-4) (Hayes *et al.*, 1995; D'Andrea *et al.*, 1995, Ma *et al.*, 1996), di costimoli (come CD40 ligando) (Schulz *et al.*, 2000) o l'associazione di diversi ligandi per TLR (ad esempio ligandi per TLR7/8 o per TLR9 assieme a ligandi per TLR3 o TLR4) (Whitmore *et al.*, 2004; Gautier *et al.*, 2005; Napolitani *et al.*, 2005). Questo indica che i diversi ligandi per PRRs espressi dai patogeni durante un'infezione cooperano per indurre la produzione di IL-12, che viene anche regolata da fattori solubili o da interazioni tra ligando e recettore di superficie. Come IL-12 anche IL-23 è una citochina eterodimerica composta da uno specifico polipeptide p19 legato alla catena p40 che viene condivisa con IL-12 (Oppmann, *et al.*, 2000). Studi precedenti su IL-23 sono stati resi difficili dai limitati sistemi disponibili per rilevare i livelli di proteina espressi. L'analisi di immunoprecipitati con anticorpi anti IL-23p19, anti IL-12p35 e anti p40 ci ha permesso di analizzare sia i singoli componenti del complesso IL-12/IL-23, inclusa la catena p40 libera, sia l'assemblaggio dell'eterodimero IL-23. Gli esperimenti condotti con immunoprecipitati e test ELISA, quest'ultimo solo recentemente disponibile per IL-23, indicano alcune caratteristiche comuni nella regolazione della produzione di IL-12 e IL-23. Entrambe le citochine sono prodotte in maniera efficiente sia da DC purificate da sangue periferico che da mono-DC. Molti degli stimoli (ad esempio LPS o poly-(I:C)) associati con R848 (ligando per TLR7/8) che inducono la massima espressione di IL-12, inducono anche l'espressione di IL-23. Comunque i nostri dati rivelano che c'è una diversa

espressione di IL-12 e IL-23 quando le DC sono attivate da alcune associazioni di ligandi per PRRs che mimano strutture complesse come quelle associate ai microorganismi. Questi dati attribuiscono un ruolo cruciale a IFN- γ , TLR7/8 e TLR2 nel determinare l'espressione preferenziale di IL-12 o di IL-23.

Sebbene la stimolazione combinata delle DC con LPS+R848 induca sinergicamente la produzione sia di IL-12 che di IL-23, inizialmente nei nostri studi abbiamo osservato che l'attivazione di DC con due microorganismi complessi come *Mycobacterium tuberculosis* (ceppo H37Rv) ed il lievito zymosan induceva in maniera efficiente IL-23, ma nessuna produzione di IL-12p75. Quando le DC erano stimulate con H37Rv o zymosan associati al ligando R848 o erano preattivate con IFN- γ inducevano una notevole espressione di IL-12p75 senza che ci fosse un aumento dell'effetto sulla produzione di IL-23. Quindi l'espressione delle due citochine sembra essere strettamente dipendente dai PRRs attivati dai diversi microorganismi come è rappresentato nella figura 15.

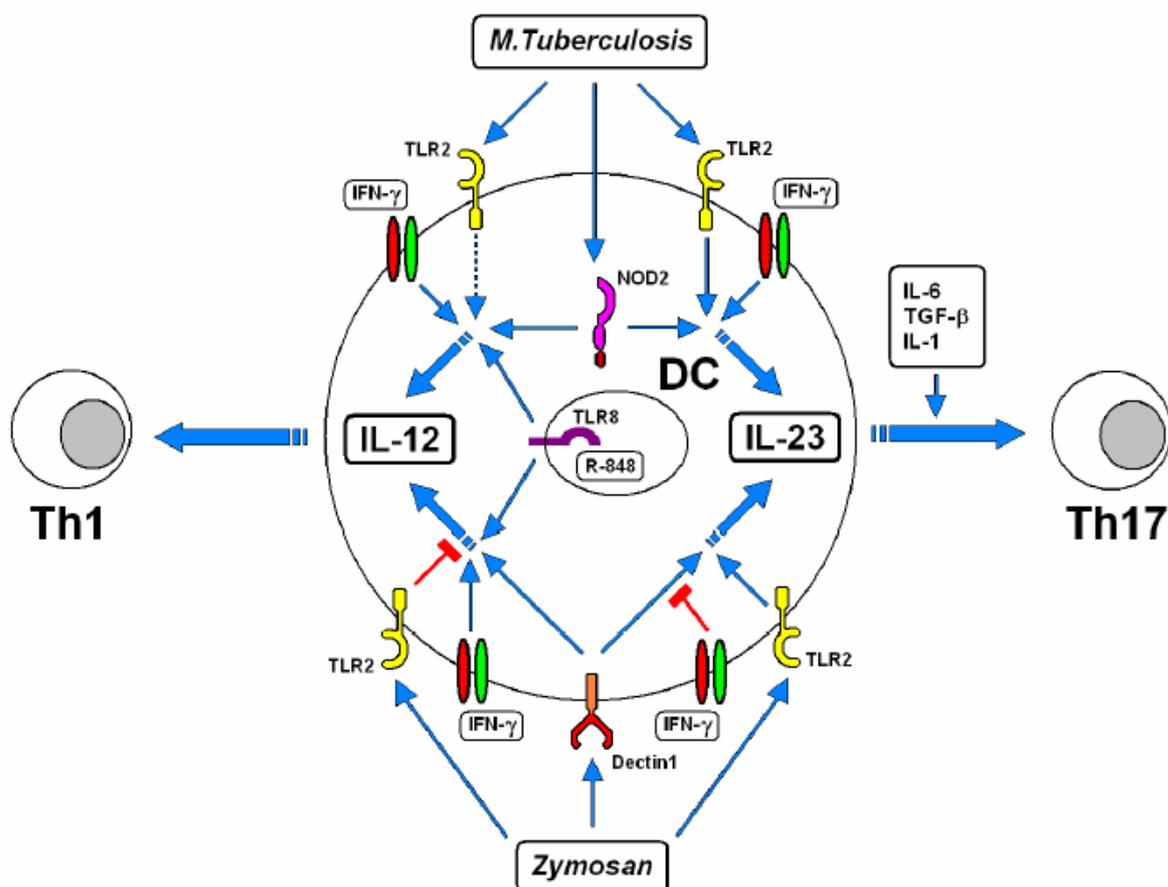


Figura 15. Schema della diversa regolazione della produzione di IL-12 e IL-23 indotta da *Mycobacterium tuberculosis* o da zymosan in mono-DC. NOD2 e TLR2 sono i principali PRRs che riconoscono *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* o ligandi per NOD2 associati a TLR2 sono in grado di indurre produzione di IL-23 in mono-DC e questa produzione è ulteriormente aumentata dal trattamento con IFN- γ . Diversamente da quanto avviene per IL-23, *Mycobacterium tuberculosis* o ligandi per NOD2 associati a TLR2 sono in grado di indurre produzione di IL-12 solo se le mono-DC sono stimulate con IFN- γ . I ligandi per altri TLR (nel nostro schema TLR8) aumentano notevolmente la produzione di IL-12 indotta da *Mycobacterium tuberculosis* o da ligandi per NOD2.

Dectin-1 e TLR2 sono i principali PRRs che riconoscono lo zymosan. La stimolazione delle mono-DC con β -glucano, che è il ligando per dectin-1, induce una notevole produzione di IL-23 che è aumentata dalla costimolazione con ligandi per TLR8 o per TLR2. IFN- γ inibisce la produzione di IL-23 indotta da ligandi per dectin-1; l'associazione di ligandi per dectin-1 e TLR2 (o TLR8) con ligandi per dectin-1 supera l'inibizione indotta da IFN- γ . Per indurre la produzione di IL-12, ligandi per dectin-1 richiedono l'associazione di ligandi per TLR come TLR8. IFN- γ coopera con i ligandi per dectin-1 associati ai ligandi per TLR8 nell'aumentare notevolmente la produzione di IL-12. I ligandi per TLR2 inibiscono drasticamente la produzione di IL-12 indotta da β -glucano e da ligandi per TLR8. La capacità dello zymosan di indurre IL-23 in maniera dose-dipendente può essere attribuita al coinvolgimento simultaneo di dectin-1 e di TLR2, due recettori che agiscono attivando la produzione di questa citochina. La quantità di IL-12 prodotta, che è inversa rispetto alla dose utilizzata (in associazione con una dose fissa di R848), può essere attribuita al coinvolgimento simultaneo da parte dello zymosan del recettore attivatorio dectin-1 e di TLR2 che ha una potente azione inibitoria sulla produzione di IL-12 indotta da dectin-1. La capacità di IFN- γ di inibire la produzione di IL-23 indotta da ligandi per dectin-1 ma non dallo zymosan può dipendere dal contemporaneo coinvolgimento da parte dello zymosan sia di dectin-1 che di TLR2 che creano una condizione attivatoria per la produzione di IL-23 anche in presenza di IFN- γ .

La diversa produzione di IL-12 e di IL-23 da DC determina l'induzione delle cellule Th1 o la differenziazione delle cellule Th17. IL-12 è essenziale per l'induzione di cellule Th1 da linfociti T CD4⁺ *naive*. IL-23, insieme a TGF- β e IL-6 e con il contributo essenziale di IL-1 β , dirige la differenziazione dei linfociti T CD4⁺ *naive* in cellule Th17.

E' stato recentemente proposto un ruolo protettivo per IL-23, nell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*, basato sulla sua capacità di indurre una risposta Th17 e di promuovere la risposta delle cellule T memoria (Filipe-Santos *et al.*, 2006; Fletcher, 2007; Khader *et al.*, 2007; Umemura *et al.*, 2007; Wozniak *et al.*, 2006; Khader *et al.*, 2005). Quindi oltre al ruolo ben conosciuto e prevalente di IL-12 e IFN- γ nella protezione contro *Mycobacterium tuberculosis*, sta emergendo un ruolo anche per IL-23, in quanto la produzione bilanciata di IL-12 e IL-23 potrebbe essere cruciale nella difesa contro i patogeni intracellulari (Khader *et al.*, 2005). *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv induce IL-12p75 in mono-DC solo dopo la preattivazione con IFN- γ e/o la costimolazione con R848, mentre IL-23 viene indotta da H37Rv da solo e viene influenzata solo modestamente dalla costimolazione. La diversa regolazione della produzione di IL-12 e IL-23 è ancora più evidente in DC isolate da sangue periferico, preattivate con IFN- γ e stimulate con H37Rv, nelle

quali la costimolazione con R848 non solo aumenta notevolmente la produzione di IL-12p75 ma inibisce anche la produzione di IL-23. Tra i PRRs in grado di riconoscere il micobatterio (Bafica *et al.*, 2005; Brightbill *et al.*, 1999; Ferwerda *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2004; Means *et al.*, 1999), la stimolazione di TLR2 assieme al NOD2 è richiesta per la produzione di TNF (Ferwerda *et al.*, 2005). I nostri risultati mostrano che l'associazione del ligando MDP per NOD2 con il ligando Pam3C o Pam2C per TLR2 o con R848 induce sia IL-12 che IL-23 in mono-DC preattivate con IFN- γ . Si osserva un'attivazione forte e riproducibile preferenzialmente di IL-12, indotta dalla combinazione di ligandi per NOD2 e TLR7/8 e di IL-23 indotta dalla combinazione di ligandi per NOD2 e TLR2. Il profilo di espressione di queste citochine indotto dalla combinazione di MDP e Pam3C (o Pam2C) associati a R848 è simile a quello indotto rispettivamente da H37Rv da solo o associato con R848, suggerendo così che NOD2 e TLR2 agendo insieme sono recettori cruciali per l'espressione di IL-12 e IL-23 in risposta a *Mycobacterium tuberculosis*. Le cellule dendritiche derivate da pazienti NOD2^{-/-} hanno una diminuita produzione di IL-12 in risposta a H37Rv. Oltre a NOD2 e TLR2, *Mycobacterium tuberculosis* esprime ligandi sensibili al calore per TLR4 che potrebbero cooperare con altri PRRs per l'induzione di citochine (Means *et al.*, 1999). E' interessante notare che nel topo TLR9 ha un ruolo importante nella produzione di IL-12p40, mentre TLR2 è responsabile principalmente della produzione di TNF (Bafica *et al.*, 2005). Cellule dendritiche umane non esprimono TLR9 (Kadowaki *et al.*, 2001) e questo potrebbe spiegare perchè *Mycobacterium tuberculosis* è scarsamente efficiente nell'indurre IL-12 in colture di DC umane. La costimolazione con R848, un ligando per TLR8 che è ampiamente espresso su DC umane, può mimare l'effetto dei ligandi del micobatterio per TLR9 sulle DC di topo.

Come *Mycobacterium tuberculosis* anche lo zymosan del lievito induce produzione di IL-23 in assenza di IL-12p75. Sia *Mycobacterium tuberculosis* che lo zymosan richiedono, per indurre IL-12p75, la costimolazione delle DC con R848, con IFN- γ o la loro associazione. La combinazione del ligando per TLR2 (Pam2C) e del ligando per dectin-1 (β -glucano) che sono i più importanti

ligandi per PRRs presenti nello zymosan, ci permette di identificare TLR2 come un PRR cruciale nella regolazione della diversa espressione di IL-12 e IL-23.

β -glucano induce alti livelli di IL-23 in mono-DC, confrontabili con i recenti dati riportati per le DC di topo (Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007), e questa produzione viene aumentata da due a tre volte in seguito alla costimolazione con ligandi per TLR2 o per TLR7/8. La produzione di IL-12p75 viene indotta solo da β -glucano associato a R848 e non dal β -glucano da solo o in combinazione con ligandi per TLR2. Inoltre la produzione di IL-12 indotta da β -glucano e R848, diversamente da IL-23, viene drasticamente inibita dall'aggiunta di ligandi per TLR2. IL-23 viene preferenzialmente indotta da alte dosi di zymosan, mentre IL-12 è indotta in maniera più efficiente da basse dosi di zymosan associate a R848 e/o IFN- γ . Questa paradossale produzione che è inversa rispetto alla dose di stimolo aggiunto viene probabilmente spiegata dal diverso contributo dei ligandi di dectin-1 e TLR2 quando lo zymosan è utilizzato a basse o alte dosi.

IL-10, che ha un potente effetto inibitorio sulla produzione di IL-12 (D'Andrea *et al.*, 1993), viene indotta anche dallo zymosan (Qi *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2005) e la sua produzione è aumentata da ligandi per TLR2 (Re *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2004; Dillon *et al.*, 2004). Tuttavia, nonostante IL-10 inibisca efficientemente la produzione di IL-23, abbiamo visto che Pam2C continua ad esercitare la sua attività inibitoria sulla produzione di IL-12p75 anche in presenza di anticorpi neutralizzanti IL-10 escludendo così che sia IL-10 a mediare l'inibizione di IL-12p75 da parte di ligandi per TLR2. Studi precedenti riportano che ligandi per TLR2 promuovono risposte di tipo Th2 e risposte da cellule T regolatorie attraverso un meccanismo che coinvolge la produzione di IL-10 (Dillon *et al.*, 2004; Suttmuller *et al.*, 2006). IL-12p75 favorisce le risposte di tipo Th1 e blocca la differenziazione di altre sottopopolazioni di cellule T incluse le Th17 che invece sono sostenute da IL-23. Quindi i nostri risultati indicano un nuovo meccanismo per il recettore TLR2 che, inibendo IL-12p75 in maniera indipendente da IL-10 e aumentando la produzione di IL-23, può modulare le risposte Th.

IFN- γ aumenta la trascrizione di geni che codificano sia per p40 che per p35 ed ha un marcato effetto sulla produzione dell'eterodimero IL-12p75 (Liu,

et al., 2003). Quindi è sembrato ragionevole ipotizzare un simile effetto di IFN- γ sulla produzione di IL-23. Infatti IFN- γ è necessario per avere una produzione ottimale di IL-12 e IL-23 da mono-DC stimulate con LPS e anche da DC isolate da sangue e da mono-DC stimulate con H37Rv da solo o associato a R848. Comunque l'effetto di IFN- γ di aumentare la produzione di IL-23 è dipendente strettamente dal tipo di PRR attivato, visto che la produzione di IL-23 indotta da β -glucano, diversamente da quella di IL-12, viene inibita da IFN- γ sia a livello di proteine che di produzione di mRNA. Dall'altro lato IFN- γ ha l'effetto di aumentare IL-12 indotta da basse concentrazioni di zymosan. Dal momento che i ligandi per TLR2 aumentano la produzione di IL-23 in cellule stimulate con β -glucano, sia non preattivate che preattivate con IFN- γ , è possibile che i diversi risultati ottenuti usando β -glucano o zymosan siano dovuti al coinvolgimento di TLR2 o di altri PRRs da parte di ligandi presenti nel lievito. IFN- γ inibisce la produzione di IL-10 usando diversi induttori (Donnelly, *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2006). Il meccanismo attraverso il quale IFN- γ inibisce IL-10 coinvolge GSK3 e i fattori di trascrizione CREB/AP1 (Hu *et al.*, 2006). La scoperta che sia IL-23 che IL-10 sono inibite da IFN- γ fa pensare ad una possibile similitudine nel meccanismo con cui dectin-1 induce i due geni. La dissociata produzione delle citochine IL-12 e IL-23 è già stata riportata per il lievito *Candida*, che induce sia IL-12 che IL-23, diversamente dalle ife che inducono solo IL-23 (Acosta-Rodriguez, *et al.*, 2007). Questi dati, che concordano con dati precedenti nel topo (Fè d'Ostiani *et al.*, 2000), ma non con altri dati riportati per le DC umane (Romagnoli *et al.*, 2004), indicano incapacità delle ife di indurre IL-12. Dato che il β -glucano è esposto solo nel lievito e non nella forma filamentosa (Gantner *et al.*, 2005) è possibile che ci siano altri recettori oltre a dectin-1 che svolgono un ruolo rilevante nell'induzione di IL-23 da parte di *Candida*. La capacità dello zymosan di indurre IL-23 e IL-12 viene inoltre bloccata dalla laminarina suggerendo così che il recettore per il β -glucano abbia un ruolo primario nell'induzione di entrambe le citochine da parte dello zymosan.

Ci sono dati che suggeriscono un ruolo importante sia per IL-23/IL-17 sia per il recettore dectin-1 nella resistenza ai funghi (Huang *et al.*, 2004;

Kleinschek *et al.*, 2006, Saijo *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007). I soprannatanti di DC umane stimolate con zymosan o β -glucano, che contengono IL-23, inducono cellule T CD4⁺ naive, dopo stimolazione policlonale, a produrre IL-17. La produzione di IL-17 non viene influenzata, o viene leggermente aumentata da anticorpi neutralizzanti IL-12, mentre è diminuita da un anticorpo per IL-12p40, che neutralizza sia IL-12 che IL-23. Il soprannatante di cellule stimolate con LPS + R848 che contiene anch'esso IL-23 non è in grado di indurre IL-17. Questa incapacità del soprannatante di LPS+R848 di indurre produzione di IL-12 è dovuta all'assenza di alte concentrazioni di IL-1 β che invece sono presenti nei soprannatanti indotti da zymosan e da β -glucano. Per indurre IL-17 in cellule T CD4⁺ umane è richiesta IL-1 β in combinazione con una o più citochine come IL-23, TGF- β e IL-6 come suggerito anche da altri studi (Van Beelen, *et al.*, 2007; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007). Quindi le diverse quantità di IL-1 β prodotte dai vari stimoli che abbiamo usato sono responsabili della diversa induzione della produzione di IL-17. La capacità dei soprannatanti di indurre IFN- γ da cellule T CD4⁺ correla con il loro contenuto di IL-12 ed è completamente bloccata da anticorpi neutralizzanti IL-12. Cellule T umane, stimolate con IL-12, richiedono per la produzione di IFN- γ anche IL-1 β (D'Andrea *et al.*, 1993); comunque per questo effetto sono necessarie concentrazioni molto più basse di IL-1 β di quelle richieste per la produzione di IL-17 e probabilmente IL-1 β è presente in quantità sufficiente in tutti i soprannatanti prodotti da colture di cellule T per permettere la produzione di IFN- γ . L'anticorpo anti TGF- β inibisce la produzione di IL-17. Studi precedenti (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007) non sono riusciti ad evidenziare un effetto del TGF- β esogeno sulla differenziazione di cellule Th17 umane suggerendo che TGF- β endogeno presente nelle colture è sufficiente per permettere la produzione di IL-17 mentre TGF- β esogeno non ha effetto o inibisce IL-17. La necessità della presenza di TGF- β per indurre la produzione di IL-17 potrebbe essere in parte dovuta al suo effetto inibitorio sulla produzione di IFN- γ oltre ad un effetto diretto sulla differenziazione delle cellule T.

La diversa regolazione delle citochine IL-12 e IL-23 attraverso diverse associazioni di PRRs può portare ad una preferenziale produzione di IL-23 che è responsabile dell'infiammazione cronica e delle risposte Th17 associate a questa citochina. In particolare abbiamo trovato che la produzione di IL-23 può essere aumentata o inibita da IFN- γ a seconda di quale recettore sia coinvolto nell'induzione di IL-23. Questo può avere importanti conseguenze in molti tipi di infezioni come nelle infezioni da micobatterio nelle quali la forte risposta Th1 con alti livelli di IFN- γ potrebbe non bloccare la produzione simultanea o successiva di IL-23 e nello stesso tempo potrebbe impedire un completo sviluppo delle risposte Th17 agendo sulle cellule T. Nelle infezioni fungine, la presenza di una forte risposta Th1 può prevenire la produzione di IL-23 mediata dalla stimolazione di dectin-1 e fornire un meccanismo regolatorio aggiuntivo che agisce a livello di APC per prevenire la generazione di cellule Th17. Dai nostri dati, sia i ligandi per TLR1/2 che per TLR2/6, quando associati con la stimolazione di NOD2 o dectin-1, inducono preferenzialmente IL-23 piuttosto che IL-12 e quando sono associati con diverse combinazioni di ligandi, che inducono IL-12 in maniera molto efficiente, bloccano la produzione di IL-12. L'effetto contrastante dell'azione di diversi ligandi per TLR è esemplificato dal β -glucano che da solo o in associazione con ligandi per TLR2 induce solamente la produzione di IL-23, mentre in associazione con R848 rappresenta lo stimolo più potente per l'induzione di IL-12, anche più potente della combinazione LPS + R848. Oltre a questo i nostri dati indicano che IL-23 e IL-12, due citochine che hanno effetto principalmente sulle risposte Th17 e Th1, rispettivamente, sono regolate in maniera diversa dai vari ligandi per PRRs espressi dai microorganismi, ed è la diversa induzione della produzione di IL-1 β che può influenzare profondamente la produzione di IL-17 e le risposte Th17.

In conclusione, sono sia i fattori intrinseci dei patogeni, che le componenti regolatorie delle risposte infiammatorie e immunitarie a influenzare la natura della risposta innata e immunitaria all'infezione, così come anche la sua evoluzione, quando l'infezione progredisce o si risolve.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto.** 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-949.
- Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani.** 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639-646.
- Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.H. Xie, F.J. de Sauvage, A.L. Gurney.** 2003. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 278:1910-1914.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi.** 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Bafica, A., C.A. Scanga, C.G. Feng, C. Leifer, A. Cheever, and A. Sher.** 2005. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 202:1715-1724.
- Banchereau, J. and R.M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 391:245-252.
- Brightbill, H.D., D.H. Libraty, S.R. Krutzik, R.B. Yang, J.T. Belisle, J.R. Bleharski, M. Maitland, M.V. Norgard, S.E. Plevy, S.T. Smale, P.J. Brennan, B.R. Bloom, P.J. Godowski, and R.L. Modlin.** 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285:732-736.
- Brown, G.D. and S.Gordon.** 2001. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. *Nature* 413:36-37.
- Brown, G.D., J. Herre, D.L. Williams, J.A. Willment, A.S. Marshall, and S. Gordon.** 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 197:1119-1124.
- Carra, G., F. Gerosa, and G. Trinchieri.** 2000. Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12. *J Immunol* 164:4752-4761.
- Cua D.J., J. Sherlock, Y. Chen, C.A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S.A. Lira, D. Gorman, R.A. Kastelein, J.D. Sedgwick** 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
- D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N.M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri.** 1993. Interleukin-10 inhibits human lymphocyte IFN-gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178:1041-1048.
- D'Andrea, A., M. Rengaraju, N.M. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Aste, S.H. Chan, M. Kobayashi, D. Young, E. Nickbarg, R. Chizzonite, S.F. Wolf, and G. Trinchieri.** 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 176:1387-1398.
- D'Andrea, A., X. Ma, M. Aste-Amezaga, C. Paganin, and G. Trinchieri.** 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 181:537-546.

- Dillon, S., A. Agrawal, T. Van Dyke, G. Landreth, L. McCauley, A. Koh, C. Maliszewski, S. Akira, and B. Pulendran.** 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 172:4733-4743.
- Donnelly, R.P., S.L. Freeman, and M.P. Hayes.** 1995. Inhibition of IL-10 expression by IFN-g upregulates transcription of TNF- α in human monocytes. *J Immunol* 155:1420-1427.
- Eagar, TN, N.J. Karandikar, J.A. Bluestone, S.D. Miller.** 2002. The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* 32:972-981.
- Fè d'Ostiani, C., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, and L. Romani.** 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 191:1661-1674.
- Ferwerda, G., S.E. Girardin, B.J. Kullberg, L. Le Bourhis, D.J. de Jong, D.M. Langenberg, R. van Crevel, G.J. Adema, T.H. Ottenhoff, J.W. Van der Meer, and M.G. Netea.** 2005. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 1:279-285.
- Filipe-Santos, O., J. Bustamante, A. Chagnier, G. Vogt, L. de Beaucoudrey, J. Feinberg, E. Jouanguy, S. Boisson-Dupuis, C. Fieschi, C. Picard, and J.L. Casanova.** 2006. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* 18:347-361.
- Fletcher, H.A.** 2007. Correlates of immune protection from tuberculosis. *Curr Mol Med* 7:319-325.
- Flores, R.R., K.A. Diggs, L.M. Tait, and P.A. Morel.** 2007. IFN-gamma negatively regulates CpG-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* 178:211-218.
- Gantner, B.N., R.M. Simmons, and D.M. Underhill.** 2005. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J* 24:1277-1286.
- Gantner, B.N., R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira, and D.M. Underhill.** 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 197:1107-1117.
- Gautier, G., M. Humbert, F. Deauvieau, M. Sculler, J. Hiscott, E.E. Bates, G. Trinchieri, C. Caux, and P. Garrone.** 2005. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 201:1435-1446.
- Giachino, D., M.M. van Duist, S. Regazzoni, D. Gregori, M. Bardessono, P. Salacone, N. Scaglione, R. Sostegni, N. Sapone, F. Bresso, A. Sambataro, E. Gaia, A. Pera, M. Astegiano, and M. De Marchi.** 2004. Analysis of the CARD15 variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. *Eur J Hum Genet* 12:206-212.
- Gillessen, S., D. Carvajal, P. Ling, F.J. Podlaski, D.L. Stremlo, P.C. Familletti, U. Gubler, D.H. Presky, A.S. Stern, M.K. Gately.** 1995. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur J Immunol* 25:200-206.
- Hashimoto, C., K.L. Hudson and K.V. Anderson.** 1988. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.

- Hayes, M.P., J. Wang, and M.A. Norcross.** 1995. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* 86:646-650.
- Hu, X., P.K. Paik, J. Chen, A. Yarilina, L. Kockeritz, T.T. Lu, J.R. Woodgett, and L.B. Ivashkiv.** 2006. IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24:563-574.
- Huang, W., L. Na, P.L. Fidel, and P. Schwarzenberger.** 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 190:624-631.
- Hue, S., P. Ahern, S. Buonocore, M.C. Kullberg, D.J. Cua, B.S. McKenzie, F. Powrie, and K.J. Maloy.** 2006. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203:2473-2483.
- Hugot, J.P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.P. Cézard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C.A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.F. Colombel, M. Sahbatou, G. Thomas.** 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 31:599-603.
- Hunter C.A.** 2005. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 5:521-531.
- Inohara, N., M. Chamaillard, C. McDonald, G. Nuñez.** 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem.* 74:355-383.
- Jang, S., S. Uematsu, S. Akira, and P. Salgame.** 2004. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to Mycobacterium tuberculosis is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol* 173:3392-3397.
- Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R.W. Malefyt, R.A. Kastelein, F. Bazan, and Y.J. Liu.** 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194:863-869.
- Karin M., Lawrence T., Nizet V.** 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124: 823-835.
- Khader, S.A., G.K. Bell, J.E. Pearl, J.J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G.E. Cilley, F. Shen, S.M. Eaton, S.L. Gaffen, S.L. Swain, R.M. Locksley, L. Haynes, T.D. Randall, and A.M. Cooper.** 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 8:369-377.
- Khader, S.A., J.E. Pearl, K. Sakamoto, L. Gilmartin, G.K. Bell, D.M. Jelley-Gibbs, N. Ghilardi, F. deSavage, and A.M. Cooper.** 2005. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol* 175:788-795.
- Kleinschek, M.A., U. Muller, S.J. Brodie, W. Stenzel, G. Kohler, W.M. Blumenschein, R.K. Straubinger, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and G. Alber.** 2006. IL-23 enhances the inflammatory cell response in Cryptococcus neoformans infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol* 176:1098-1106.
- Kobayashi, KS, M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nuñez, R.A. Flavell.** 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 4:731-734.

- Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, G. Trinchieri.** 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170:827-846.
- Leibundgut-Landmann, S., O. Gross, M.J. Robinson, F. Osorio, E.C. Slack, S.V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G.D. Brown, J. Ruland, and E.S.C. Reis.** 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 8:630-638.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart and J.A. Hoffman.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Liu, J., S. Cao, L.M. Herman, and X. Ma.** 2003. Differential regulation of interleukin (IL)- 12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J Exp Med* 198:1265-1276.
- Ma, X., J.M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S.F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri.** 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* 183:147-157.
- Maizel, J.V.** 1971. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral protein. Academic Press, New York. 179-191 pp.
- Medzhitov, R.** 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
- Merberg, D.M., S.F. Wolf, S.C. Clark.** 1992 Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunol Today* 13:77-78.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia.** 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6:769-776.
- Netea, M.G., R. Suttmuller, C. Hermann, C.A. Van der Graaf, J.W. Van der Meer, J.H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema, and B.J. Kullberg.** 2004. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 172:3712-3718.
- Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J.C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J.S. Abrams, K.W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J.F. Bazan, R.A. Kastelein.** 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715-725.
- Qi, H., T.L. Denning, and L. Soong.** 2003. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T cell cytokine profiles. *Infect Immun* 71:3337-3342.
- Re, F., and J.L. Strominger.** 2004. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* 173:7548-7555.
- Rogers, N.C., E.C. Slack, A.D. Edwards, M.A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D.L. Williams, S. Gordon, V.L. Tybulewicz, G.D. Brown, and C. Reis e Sousa.** 2005. Sykdependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22:507-517.

- Romagnoli, G., R. Nisini, P. Chiani, S. Mariotti, R. Teloni, A. Cassone, and A. Torosantucci.** 2004. The interaction of human dendritic cells with yeast and germ-tube forms of *Candida albicans* leads to efficient fungal processing, dendritic cell maturation, and acquisition of a Th1 response-promoting function. *J Leukoc Biol* 75:117-126.
- Saijo, S., N. Fujikado, T. Furuta, S.H. Chung, H. Kotaki, K. Seki, K. Sudo, S. Akira, Y. Adachi, N. Ohno, T. Kinjo, K. Nakamura, K. Kawakami, and Y. Iwakura.** 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 8:39-46.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia.** 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1:1109-1118.
- Schulz, O., D.A. Edwards, M. Schito, J. Aliberti, S. Manickasingham, A. Sher, and C. Reis e Sousa.** 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13:453-462.
- Steele, C., L. Marrero, S. Swain, A.G. Harmsen, M. Zheng, G.D. Brown, S. Gordon, J.E. Shellito and J.K. Kolls.** 2003. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med*. 198:1677-1688.
- Sutmoller, R.P., M.H. den Brok, M. Kramer, E.J. Bennink, L.W. Toonen, B.J. Kullberg, L.A. Joosten, S. Akira, M.G. Netea, and G.J. Adema.** 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 116:485-494.
- Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R.L. Modlin, S. Akira.** 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 169:10-14.
- Taylor, P.R., S.V. Tsoni, J.A. Willment, K.M. Dennehy, M. Rosas, H. Findon, K. Haynes, C. Steele, M. Botto, S. Gordon, and G.D. Brown.** 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* 8:31-38.
- Trinchieri, G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133-146.
- Trinchieri, G., and A. Sher.** 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
- Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M.D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, T. Suda, K. Sudo, S. Nakae, Y. Iwakura, and G. Matsuzaki.** 2007. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol* 178:3786-3796.
- Underhill, D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti, A. Aderem.** 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815.
- Van Beelen, A.J., Z. Zelinkova, E.W. Taanman-Kueter, F.J. Muller, D.W. Hommes, S.A. Zaat, M.L. Kapsenberg, and E.C. de Jong.** 2007. Stimulation of the Intracellular Bacterial Sensor NOD2 Programs Dendritic Cells to Promote Interleukin-17 Production in Human Memory T Cells. *Immunity* 27:660-669.
- Veldhoen, M., R.J. Hocking, R.A. Flavell and B. Stockinger.** 2006. Signals mediated by transforming growth factor- β initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol*. 7:1151-1156.

- Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger.** 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17- producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
- Whitmore, M.M., M.J. DeVeer, A. Edling, R.K. Oates, B. Simons, D. Lindner, and B.R. Williams.** 2004. Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res* 64:5850-5860.
- Wilson, N.J., K. Boniface, J.R. Chan, B.S. McKenzie, W.M. Blumenschein, J.D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J.C. Lecron, R.A. Kastelein, D.J. Cua, T.K. McClanahan, E.P. Bowman, and R. de Waal Malefyt.** 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950-957.
- Wolf, S.F., P.A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, R.M. Hewick.** 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol.* 1:3074-3081.
- Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah, R. Sabat.** 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21:241-254.
- Wozniak, T.M., A.A. Ryan, and W.J. Britton.** 2006. Interleukin-23 restores immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in IL-12p40-deficient mice and is not required for the development of IL-17-secreting T cell responses. *J Immunol* 177:8684-8692.
- Yoshitomi, H., N. Sakaguchi, K. Kobayashi, G.D. Brown, T. Tagami, T. Sakihama, K. Hirota, S. Tanaka, T. Nomura, I. Miki, S. Gordon, S. Akira, T. Nakamura, and S. Sakaguchi.** 2005. A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *J Exp Med.* 201:949-960.