



Papel de los Liver X Receptors en la activación por IFN- γ y la proliferación de macrófagos y microglía. Implicaciones en neuroinflamación

Mónica Pascual García

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**PAPEL DE LOS LIVER X RECEPTORS EN LA
ACTIVACIÓN POR IFN- γ Y LA
PROLIFERACIÓN DE MACRÓFAGOS Y
MICROGLÍA. IMPLICACIONES EN
NEUROINFLAMACIÓN.**



Doctorado en Biomedicina

Departamento de Fisiología e Inmunología. Facultad de Biología

Doctorando,

Mónica Pascual García

Directora de la tesis,

Annabel Valledor Fernandez

ÍNDICE

Índice	1
Listado de Abreviaturas	5
Introducción	13
1.- Los macrófagos	15
1.1.- Origen y diferenciación de los macrófagos	16
1.2.- Proliferación	17
1.2.1.- Regulación del ciclo celular	18
1.3.- Activación de los macrófagos	22
1.3.1.- El Interferón-gamma	24
<i>Funciones del IFN-γ</i>	27
1.4.- IFN- γ , activación de las células de microglía y neuroinflamción	34
1.5.- Macrófagos y homeostasis lipídica	36
2.- Receptores Nucleares	37
2.1.- Liver X Receptors (LXR)	40
<i>LXR en la regulación del metabolismo</i>	41
<i>LXR en la regulación de la proliferación</i>	43
<i>LXR en la regulación de la inflamación</i>	44
<i>LXR en la regulación positiva de genes con papel específico en la respuesta Inmune</i>	48
<i>LXR en el sistema nervioso central</i>	49

Material y Métodos -----	51
Objetivos -----	65
Resultados -----	69
Discusión -----	115
Conclusiones -----	127
Bibliografía -----	151
Apéndice -----	157

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADAR	Adenosina deaminasa específica de ARN
AF	<i>Activation function</i> (Función activadora)
AIM	<i>Apoptosis inhibitory protein secreted by macrophages</i> (Inhibidor de apoptosis secretado por macrófagos)
AML1	<i>Acute myeloid leukemia 1</i> (leucemia mieloide aguda 1)
AP-1	<i>Activating protein-1</i> (Proteína activadora-1)
Apo	Apolipoproteína
APR	<i>Acute phase response</i> (Respuesta de fase aguda)
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer-binding protein</i> (proteína de unión a enhancer/CCAAT)
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
Ccl	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i> (ligando quimioquina con motivo C-C)
CDC	<i>Cell division cycle</i> (ciclo de división celular)
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (quinasa dependiente de ciclina)
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i> (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina)
ChREBP	<i>Carbohydrate response element binding protein</i> (Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos)
CIITA	<i>Class II transactivator</i> (transactivador de clase II)
Cip	CDK-interacting protein (proteína de interacción con CDK)
CORO2A	Coronina2A
COUP-TF	<i>COUP Transcription factor</i>
CPA	Célula presentadora de antígeno
CSF-1	<i>Colony stimulating factor 1</i> (factor estimulador de colonias 1)
Cxcl	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i> (ligando quimioquina con motivo C-X-C)
DAP	<i>Death associated proteins</i> (proteína asociada a muerte)
DAX-1	<i>Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i>
DBD	<i>DNA-binding domain</i> (dominio de unión al ADN)
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i> (quinasa regulada por señal extracelular)
ERR	<i>Estrogen-related receptor</i>

FcγR	Receptor de la fracción constante de IgG
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
GAS	<i>Gamma interferon activated sequence</i> (secuencia activada por IFN-γ)
GLUT4	Transportador de glucosa de respuesta a insulina 4
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> (factor estimulador de colonias de marófagos y granulocitos)
GNCF	<i>Germ cell nuclear factor</i>
GP96	<i>Tumour rejection antigen 96</i> (antígeno de rechazo a tumor 96)
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i> (proteína unida a receptor de factor de crecimiento 2)
HDAC	Histona deacetilasa
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidad)
HNF4	<i>Hepatocyte nuclear factor 4</i>
HRE	<i>Hormone response element</i> (Elemento de respuesta a hormona)
ICAM	Intercellular adhesion molecule (molécula de adhesión intercelular)
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenasa
Idol	<i>Inducible degrader of the LDL receptor</i> (Degradador inducible del receptor de LDL)
IFN	Interferón
IFNGR	<i>IFN-γ receptor</i> (receptor de IFN-γ)
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL-1Ra	Receptor antagonista de la IL-1
ISRE	<i>Interferon-sensitive response element</i> (elemento de respuesta sensible a IFN)
JAK	<i>Janus kinase</i> (quinasa Janus)
JNK	<i>C-jun NH2-terminal kinase</i> (quinasa NH ₂ -terminal de c-jun)
LBD	<i>Ligand-binding domain</i> (dominio de unión a ligando)
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de baja densidad)
LHR-1	<i>Liver receptor homolog-1</i>
LMP2	<i>Large multifunctional protease 2</i> (proteasa larga multifuncional 2)
LPL	Lipoproteína lipasa

LPS	Lipopolisacárido
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinasa activada por mitógeno)
MCM	<i>Minichromosome maintenance protein</i> (proteína de mantenimiento de minicromosoma)
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i> (factor estimulador de colonia de macrófagos)
MECL-1	<i>Multicatalytic endopeptidase complex subunit-1</i> (Subunidad 1 del complejo endopeptidasa multicatalítico)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (complejo de histocompatibilidad mayor)
MIK1	<i>Mitotic inhibitor kinase 1</i> (quinasa inhibidora de mitóticos 1)
MR	<i>Mineralocorticoid receptor</i>
MYT1	<i>Myelin transcription factor 1</i> (factor de transcripción de mielina 1)
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i> (proteína inhibidora de apoptosis neuronal)
NCoR	<i>Nuclear receptor corepressor</i> (co-represor de receptores nucleares)
NFκB	<i>Nuclear factor kappa b</i> (Factor nuclear kappa B)
NGF1-b	<i>Nerve growth factor 1b-like receptor</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NOS2	<i>Nitric oxide sintase 2</i> (Sintasa inducible de óxido nítrico)
OAS	2',5'-oligoadenilato sintetasa
ORC	<i>Origin recognition complex</i> (Complejo de reconocimiento de origen)
p21WAF1	<i>Wild-type p53-activated factor</i> (factor activado por p53)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a patógeno)
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> (Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa)
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α</i> (Coactivador de PPARγ 1α)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIAS	Proteína inhibidora de Stat activado
PKR	Proteína quinasa activada por ARN
PLTP	<i>Phospholipid transfer protein</i> (Proteína de transferencia de

	fosfolípidos)
PNR	<i>Photoreceptor cell-specific nuclear receptor</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
pRb	Proteína del retinoblastoma
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> (receptor de reconocimiento de patrones)
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
Rap-1	<i>Ras GTPase-activating protein-1</i> (proteína activadora de GTPasa Ras)
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SF-1	<i>Steroidogenic factor-1</i>
SH2	Dominios homólogos a src tipo 2
SHP-1/-2	<i>SH2 domain-containing tyrosine phosphatase-1/-2</i> (tirosina fosfatasa con dominio SH2 -1 / -2)
SHP	<i>Small heterodimer partner</i>
SIM	Motivo de interacción con SUMO
SKP2	<i>S phase kinase-associated protein 2</i> (Proteína asociada a quinasa de la fase S 2)
SMRT	<i>Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors</i> (mediador de silenciamiento de receptores de retinoides y hormonas tiroideas)
SOCS	<i>Supressor of cytokine signaling</i> (supresor de señalización de citoquina)
SRC	<i>Sarcoma viral oncogene</i> (oncogen viral sarcoma)
SREBP1c	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1c</i> (Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> (transductor de señal y activador de transcripción)
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i> (Modificador tipo ubiquitina pequeño)
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i> (transportador asociado con el procesamiento de antígeno)
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i> (factor de crecimiento transformante β)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (receptor tipo Toll)

TLX	<i>Tailless homolog</i>
TNF	<i>Tumour necrosis factor</i> (factor de necrosis tumoral)
TR	<i>Thyroid hormone receptor</i>
TR2	<i>Testicular receptor 2</i>
TR4	<i>Testicular receptor 4</i>
UBC9	<i>Ubiquitin carrier protein 9</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> (molécula de adhesión a células vasculares)
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de muy baja densidad)
WEE1	<i>WEE 1 homolog 1</i> (homólogo de WEE1)

INTRODUCCIÓN

1. LOS MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células de origen mieloide con un papel fundamental tanto en la respuesta inmunológica como en la homeostasis. En la respuesta inmunológica, los macrófagos son importantes efectores de la inmunidad innata y moduladores de la inmunidad adaptativa. Los macrófagos detectan señales de peligro y fagocitan patógenos y, a continuación, presentan antígenos y modulan la activación de los linfocitos T a través de la secreción de citoquinas. Además, los macrófagos juegan un papel fundamental en la fase de resolución de la inflamación y reparación de los tejidos dañados (Stout and Suttles, 2004).

De forma general, los macrófagos se clasifican como M1 o clásicamente activados y M2 o alternativamente activados aunque podemos hablar de un tercer tipo de macrófagos deactivados como veremos más adelante. Estos macrófagos polarizados difieren en la expresión de receptores, las funciones efectoras y la producción de citoquinas y quimioquinas. Los macrófagos M1 se caracterizan por altos niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias, alta producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno con actividad microbicida, fomento de la respuesta linfocitaria de tipo Th1 y una fuerte actividad tumoricida. En cambio, los macrófagos M2 están involucrados en la defensa contra parásitos y el fomento de la reparación tisular (Sica and Mantovani, 2012).

Además de ser importantes efectores del sistema inmunológico, los macrófagos juegan un papel en la homeostasis de numerosos sistemas sin que ello implique una respuesta inmunológica. Por ejemplo, los macrófagos fagocitan millones de eritrocitos al día contribuyendo a la regulación del metabolismo del hierro. Los macrófagos también se encargan de la eliminación de los restos celulares que se generan durante la remodelación tisular (Mosser and Edwards, 2008). Además, en la homeostasis del colesterol los macrófagos contribuyen al flujo reverso de colesterol, proceso por el cual el colesterol se moviliza desde las células periféricas hacia el hígado para su conversión en ácidos biliares (Cuchel and Rader, 2006).

1.1 Origen y diferenciación de los macrófagos

Todos los elementos celulares presentes en la sangre (eritrocitos, monocitos, plaquetas y leucocitos) se generan a partir de un mismo progenitor presente en la médula ósea, que es la célula madre hematopoyética. El proceso mediante el cual se originan y desarrollan las células sanguíneas implica la supervivencia, proliferación y diferenciación de sus progenitores y se denomina hematopoyesis (Ogawa, 1993). A través de este proceso las células madre pierden su capacidad autorenovadora y se diferencian a otras células con un potencial diferenciador más limitado.

En la médula ósea, las interleuquinas (IL)-1, IL-3 y/o IL-6 inducen la división de la célula madre dando lugar a una célula madre y una célula mieloide pluripotente. Esta división se conoce como heteromitosis y la célula mieloide pluripotente también se conoce como unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, megacariocitos y macrófagos (GEMM-CFU). En presencia de IL-1 y/o IL-3, este precursor se transforma en el progenitor de granulocitos y macrófagos (GM-CFU) a partir del cual se origina la unidad formadora de macrófagos (M-CFU) gracias a la acción de los factores de crecimiento M-CSF (*Macrophage colony stimulating factor*), GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) e IL-3. A partir de la M-CFU se diferenciarán las células dendríticas mieloides y los monocitos. La generación de los monocitos necesita la presencia de M-CSF, el cual induce la diferenciación de la M-CFU en monoblasto, promonocito y monocito. El proceso de diferenciación de monocitos está mediado por diferentes factores de transcripción como PU.1, C/EBP (*CCAAT/Enhancer-binding protein*) y AML1 (*acute myeloid leukemia 1*) (Valledor et al., 1998). Una vez formados, los monocitos acceden al torrente sanguíneo y circulan durante días hasta entrar en los tejidos, donde culminan su diferenciación hacia macrófagos. Dependiendo del tejido donde residen, los macrófagos dan lugar a diferentes tipos celulares como células de Kupffer en el hígado, células de Langerhans en la dermis, osteoclastos en el hueso, microglía en el cerebro o macrófagos alveolares en los pulmones. No obstante, algunas de estas poblaciones no requieren del reemplazamiento continuo por monocitos sino que tienen capacidad de automantenimiento por proliferación de los macrófagos residentes (Gordon and Taylor, 2005).

1.2 Proliferación

Los macrófagos proliferan en presencia de factores de crecimiento como el M-CSF, el GM-CSF y la IL-3. Estos factores son importantes en la diferenciación de los macrófagos a partir de médula ósea, en su proliferación y en su supervivencia. Mientras que el M-CSF es el principal factor de crecimiento que regula la generación de macrófagos, el GM-CSF y la IL-3 también inducen la diferenciación de otros tipos celulares como granulocitos, megacariocitos y eritrocitos.

El M-CSF, también conocido como CSF-1 (*colony stimulating factor 1*), está producido principalmente por los fibroblastos, las células endoteliales y las células del sistema fagocítico mononuclear incluyendo los propios macrófagos (Fixe and Praloran, 1997). La mayor parte de los efectos del M-CSF se producen a nivel local y su falta, en ausencia de otros factores de diferenciación o supervivencia, provoca la muerte de los macrófagos por apoptosis.

La interacción del M-CSF con su receptor induce la activación de diversas vías de señalización (Hamilton, 1997; McCubrey and May, 2000). El receptor del M-CSF pertenece a la familia de receptores tirosina quinasa de clase III y su activación se produce tras la unión de M-CSF al dominio extracelular del receptor. Tras la activación del receptor tiene lugar la autofosforilación de varios residuos tirosina, que se convierten en un lugar de unión para moléculas citosólicas con dominios homólogos a src de tipo 2 (SH2) como son las quinasas de la familia SRC (*sarcoma viral oncogene*) (Courtneidge et al., 1993), GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) (Van der Geer and Hunter, 1993), STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) (Novak et al., 1995) y la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Shurtleff et al., 1990).

Una de las principales cascadas activadas por el receptor del M-CSF es la vía Raf-MEK[*mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ extracellular signal regulated kinase (ERK)*]-ERK1/2, que tiene un papel esencial en la proliferación de los macrófagos (Valledor et al., 2000). También se produce la activación de otras cascadas que implican a otras proteínas quinasas de la familia MAPK, como JNK (*c-jun NH2-terminal kinase*) y p38, ambas activadas a través de la activación inicial de Rac (Kyriakis et al., 1992). Aparte de las MAPK, el M-CSF

también activa la vía PI3K-Akt, implicada en la supervivencia de los macrófagos (Comalada et al., 2004).

Los receptores del GM-CSF y la IL-3 están formados por dos subunidades, α y β . La cadena α es la responsable de la especificidad del ligando. La cadena β , compartida por los receptores del GM-CSF, la IL-3 y la IL-5 (denominada cadena β común), no tiene capacidad para unir el ligando pero es la responsable de la señalización intracelular (Barreda et al., 2004). Las vías de señalización activadas por la unión del GM-CSF y la IL-3 incluyen las cascadas de señalización a través de MAPK, la PI3K y JAK2 (*Janus kinase*)/STAT5, implicadas en proliferación, supervivencia y diferenciación (Comalada et al., 2004; Groot, 1998; Liu et al., 1999).

Los macrófagos derivados de médula ósea representan un modelo celular apropiado para el estudio de los eventos moleculares que dirigen la proliferación celular. De hecho, los macrófagos fueron clave para la identificación de las ciclinas D y de CDK4 y el primer trabajo mostrando que las proteínas del ciclo celular son diana de los agentes antiproliferativos fue llevado a cabo en macrófagos (Vadiveloo, 1999).

1.2.1 Regulación del ciclo celular

El ciclo celular puede definirse como el proceso por el cual las células analizan la existencia de condiciones adecuadas para la división celular, activan la maquinaria bioquímica y transcripcional necesaria y controlan los pasos para generar dos células hijas genómicamente estables.

El ciclo celular se divide en cuatro fases secuenciales: *Gap* (G_1), síntesis (S), G_2 , mitosis (M) y una fase externa del ciclo, G_0 (Figura 1). La fase G_1 se da tras la mitosis y es un periodo de tiempo durante el cual la célula es sensible a señales positivas o negativas sobre las vías de señalización de proliferación. Durante la fase G_1 la célula incrementa de tamaño y sintetiza ARN y proteínas, preparándose para pasar a la fase S. La fase S o de síntesis es el periodo durante el cual se duplicará el material genético. Tras la fase de síntesis la célula pasa a la fase G_2 durante la cual se prepara para entrar en mitosis. La síntesis de ARN y proteínas iniciada en G_1 continúa durante las fases S y G_2 hasta que, finalmente, la célula entra en fase M. Durante la mitosis los cromosomas se organizan de manera que la célula se divide dando lugar a dos

células hijas idénticas. Tras este proceso, el ciclo celular comienza de nuevo. En algunos casos, la célula puede abandonar el ciclo celular entrar en la fase G_0 . La fase G_0 representa un estado en que las células permanecen quiescentes de forma reversible en respuesta a alta densidad celular o a privación de mitógenos (Zetterberg and Larsson, 1985). Las células pueden permanecer en G_0 durante horas, días, semanas o años antes de volver a dividirse. Esta detención es característica de las células en las que la diferenciación terminal conduce a la pérdida de la capacidad proliferativa.

El ciclo completo de división de los macrófagos tiene una duración de aproximadamente 24 horas. La fase G_1 dura unas 12 horas durante las cuales es necesaria la presencia constante de M-CSF. Una vez el factor de crecimiento determina al macrófago a entrar en la fase S, éste continúa completando las siguientes fases del ciclo de división celular independientemente de la presencia del factor de crecimiento. Los macrófagos permanecen en la fase S, G_2 y M durante 6, 4 y 2 horas, respectivamente (Rock et al., 1992).

- Los complejos ciclina/Cdk

La progresión a través del ciclo celular está dirigida por la asociación entre serina/treonina-quinazas de la familia de las quinazas dependientes de ciclina (CDKs; *cyclin-dependent kinases*) y las ciclinas (Malumbres, 2011). Las CDKs son quinazas que, en su forma libre, están inactivas y bajo el estímulo de factores de crecimiento se asocian a ciclinas y se activan. Mientras que los niveles de las CDK permanecen constantes durante el ciclo celular, la expresión de las ciclinas está regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Existen varias ciclinas y CDKs y la asociación entre ellas origina diferentes complejos que regulan la transición a través de cada una de las fases. Así, la progresión a través de G_1 está regulada por los complejos ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6 (G_1 temprana) y por los complejos ciclina E/CDK2 (G_1 tardía) (Planas-Silva and Weinberg, 1997). De la misma forma, el complejo ciclina A/CDK2 regula la transición de la fase S mientras que la activación del complejo ciclina B1/CDK1 es necesario para que tenga lugar la mitosis (Nigg, 2001). La regulación de estos complejos se lleva a cabo principalmente

mediante la regulación de la actividad de las CDK, que tiene lugar a tres niveles: asociación con las ciclinas, fosforilación y asociación con inhibidores de CDK (CDKI) (Graña and Reddy, 1995). La fosforilación de las CDK depende de la acción de quinasas como WEE1 (*WEE 1 homolog 1*), MIK1 (*mitotic inhibitor kinase 1*) y MYT1 (*myelin transcription factor 1*) y fosfatasas CDC (*cell division cycle*) 25A, 25B y 25C (Donzelli and Draetta, 2003). Estas fosfatasas son los principales efectores de la respuesta iniciada por los puntos de control del ciclo celular o *checkpoints*.

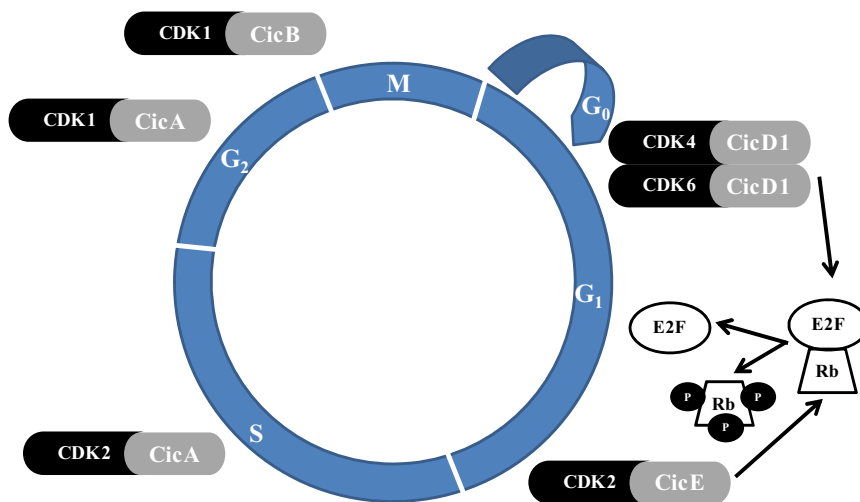


Figura 1.- Los complejos CDK/Ciclina durante el ciclo celular. Los complejos CDK4/Ciclina D1 y CDK6/Ciclina D1, durante la fase G₁ temprana, y el complejo CDK2/Ciclina E, durante la fase G₁ tardía, regulan la progresión a través de la fase G₁ y se encargan de fosforilar a la proteína pRb inactivándola y permitiendo la liberación del factor de transcripción E2F. La transición de la fase S a la fase G₂ está regulada por el complejo CDK2/Ciclina, mientras que el paso de la fase G₂ a la M está controlado por el complejo CDK1/Ciclina A y CDK1/Ciclina B.

- Inhibidores de CDK (CDKI)

La progresión a través de cada ciclo celular y la transición de una fase a otra están monitorizadas por mecanismos sensores llamados *checkpoints* o puntos de control, que mantienen el correcto orden de los eventos (Hartwell and Weinert, 1989). Existen diferentes *checkpoints* durante el ciclo celular que controlan el progreso a través de las diferentes fases: el *checkpoint* de G₁/S, el

checkpoint intra-S y el checkpoint de G₂/M (Kastan and Bartek, 2004). Si los mecanismos sensores detectan eventos aberrantes o incompletos del ciclo celular, la vía de señalización de los *checkpoints* activa a efectores que inducirán la parada del ciclo celular hasta que el problema esté resuelto. Las proteínas efectoras incluyen los inhibidores de CDK (CDKIs), los cuales pueden detener el ciclo celular de forma reversible. Una parada en G₁ puede inducirse mediante la acción de la familia Ink4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D}) de CDKIs. Las proteínas de la familia INK4 forman complejos con las CDK4 y 6 e inhiben su unión a las ciclinas bloqueando así la progresión de G₁ a S (Carnero and Hannon, 1998; Pavletich, 1999). Alternativamente, se puede inducir una parada en G₁ mediante la acción de la familia de inhibidores Cip (*CDK-interacting protein*)/Kip (p21WAF1/CIP1, p27KIP1/CIP2 y p57KIP2) (Sherr and Roberts, 1995). Los miembros de la familia CIP/KIP, inhiben las CDK de G₁/S (CDK4, CDK6 y CDK2) y en menor medida el complejo ciclina B/CDK1 (Harper et al., 1993).

- c-MYC

La expresión de c-MYC se requiere para la progresión de G₁ a S en respuesta a factores de crecimiento. c-MYC es un factor de transcripción que regula la expresión de muchos de los genes implicados en el control del ciclo celular, entre los cuales destacan las ciclinas D1, D2, A, E, CDK1 y CDK4. Por otro lado, c-MYC reprime la transcripción de p27KIP1, p21WAF1/Cip1 y p15INK4b (Amati et al., 1998). Además de su función transcripcional, se ha demostrado recientemente que c-MYC posee una función directa sobre la replicación del ADN. c-MYC interacciona con el complejo prereplicativo y su sobreexpresión aumenta el número de orígenes de replicación de manera independiente de su capacidad transcripcional (Dominguez-Sola et al., 2007).

- La proteína del retinoblastoma (pRb)

La proteína del retinoblastoma (pRb) y otros miembros de la familia, p107 y p130, son reguladores transcripcionales que reprimen una larga lista de genes, incluyendo genes críticos en la regulación del ciclo celular. Esta represión está mediada por el reclutamiento de complejos represores, como el complejo SWI/SNF, deacetilasas de histonas y la unión e inactivación de factores de transcripción como los de la familia E2F (Classon and Harlow, 2002; Macaluso et al., 2006).

Numerosas señales mitogénicas son responsables de la inactivación de la maquinaria de represión de pRb mediante la activación de Cdks (Malumbres and Barbacid, 2001; Massagué, 2004). Uno de los principales sustratos de las CDK de G₁ es precisamente pRb (Harbour and Dean, 2000). Durante la quiescencia (fase G₀) pRb está defosforilada lo que permite mantener su capacidad represora. A medida que la célula progresa a través de G₁ y entra en fase S, pRb es fosforilada por CDK4/6 y CDK2 y pierde su capacidad represora de manera que permite que se produzca una transcripción masiva durante G₁ de genes requeridos para las subsiguientes fases del ciclo celular.

- Los factores de transcripción E2F

En los mamíferos, la familia de los factores de transcripción E2F (E2F1, 2, 3, 4, 5 y 6) juega un papel esencial en la regulación de la expresión de los genes implicados en la transición G₁/S y en la síntesis del ADN. Estos genes incluyen reguladores de la entrada en S (Ciclina E, A, D1, CDK1, CDC25, c-MYC y CDK2), proteínas implicadas en la formación del complejo de prereplicación como la proteína reconocedora del origen de replicación (ORC; *origin recognition complex*), las MCM (*minichromosome maintenance protein*) y la CDC6, así como enzimas directamente ligados a la síntesis de ADN (ribonucleótido quinasa, dihidrofolato reductasa, timidina quinasa y ADN polimerasa α). Además, los factores E2F también regulan la segregación de los cromosomas, determinados procesos de remodelación de la cromatina, la apoptosis, la diferenciación y el desarrollo (Ren et al., 2002).

1.3 Activación de los macrófagos

Una vez en los tejidos, existen múltiples señales capaces de inducir la activación de los macrófagos. Ésta induce un cambio en el fenotipo de los macrófagos, con cambios en su morfología, su bioquímica y sus funciones. Dependiendo de la naturaleza del agente activador, la activación del macrófago resultará en un fenotipo u otro. Según este fenotipo, la activación del macrófago ha sido clasificada de forma general en clásica o alternativa, aunque la diversidad de estímulos y diferencias fenotípicas resultantes ha generado divergencia de opiniones al respecto (Mantovani et al., 2004).

La activación clásica de los macrófagos, o adquisición de un fenotipo de tipo M1, se caracteriza por la inducción de la sintasa inducible de óxido nítrico

(NOS2) con la consecuente producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno que tiene como finalidad aumentar la capacidad microbicida y por un incremento en su capacidad de presentar antígenos a linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Estos macrófagos son además capaces de sintetizar y secretar diferentes citoquinas y quimioquinas con la finalidad de iniciar una respuesta inmunológica adecuada y de incrementar su capacidad bactericida. Los macrófagos reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; *pathogen-associated molecular patterns*) a través de receptores PRR (*pattern recognition receptors*). Dentro de los PRR se incluyen unos receptores específicos denominados TLR (*Toll-like receptor*) (Moresco et al., 2011) que reconocen estructuras asociadas a los patógenos como algunos componentes de la pared celular de las bacterias y levaduras (como los peptidoglicanos), ARN de doble cadena (Alexopoulou and Holt, 2001), la flagelina bacteriana (Gewirtz et al., 2001) y oligodesoxinucleótidos CpG (Hemmi et al., 2003). Una de las moléculas activadoras de macrófagos más estudiadas es el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared de las bacterias gram negativas. Los macrófagos activados por LPS desarrollan una elevada capacidad fagocítica y microbicida. También producen IL-12 para dirigir la activación de los linfocitos T hacia un fenotipo Th1, de manera que estos secreten Interferón-gamma (IFN- γ). La presencia de IFN- γ en el tejido retroalimenta la activación clásica de los macrófagos, lo que tiene como consecuencia negativa cierto grado de lesión de los tejidos.

Aparte de la activación clásica, los macrófagos pueden activarse de forma alternativa en respuesta a citoquinas generadas por linfocitos de tipo Th2 (IL-4, IL-13). El fenotipo que adquieren estos macrófagos se denomina M2a (Gordon and Martinez, 2010; Benoit et al., 2008). Este tipo de macrófagos ejerce funciones inmunoreguladoras a través de la producción de IL-10 y participa en la reparación de los tejidos dañados contribuyendo a la producción de la matriz extracelular mediante un aumento de la actividad arginasa. Los macrófagos activados de esta manera aumentan la expresión del receptor antagonista de la IL-1 (IL-1Ra), de los receptores *scavenger* y de ciertas quimioquinas (Imai et al., 1999). La producción de IL-4 no está únicamente asociada a daño tisular sino que también se produce en respuesta a determinadas estructuras de algunos hongos y parásitos. Hay claras

evidencias de que estos macrófagos M2a pueden contribuir a la eliminación de helmintos y nematodos (Anthony et al., 2006; Zhao et al., 2008), sin embargo, no existen evidencias de los efectos microbicidas directos de estas células.

Existe un tercer subgrupo de macrófagos cuyo fenotipo se caracteriza por un aumento en la producción de las citoquinas IL-10 y TGF β acompañado de una disminución de la producción de IL-12. Este tipo de macrófagos se conoce como M2c o macrófagos deactivados (Benoit et al., 2008). La IL-10, las células apoptóticas, los glucocorticoides o las prostaglandinas regulan la diferenciación de los macrófagos hacia este fenotipo caracterizado por sus efectos antiinflamatorios (Mosser and Edwards, 2008).

1.3.1 El Interferón gamma

Los Interferones (IFNs) son citoquinas originalmente descritas como agentes antivíricos. Los interferones se clasifican en tipo I, tipo II y tipo III (éste último también conocido como *IFN-like cytokines*) (Pestka et al., 2004). Entre los IFNs de tipo I se incluyen IFN- α e IFN- β , que tienen una alta homología de secuencia entre ellos. IFN- γ es el único IFN de tipo II, no tiene similitud estructural con los IFNs de tipo I y además se une a un receptor diferente. Los IFNs de tipo III, por su parte, incluyen IL28A, IL28B, IL29 y limitina, ésta última exclusiva de ratón.

El IFN- γ regula el crecimiento, maduración y diferenciación de varios tipos celulares, dirige la atracción de leucocitos, aumenta la actividad de las células NK (*natural killer*) y regula las funciones de los linfocitos B.

El IFN- γ está producido principalmente por linfocitos T (CD4+ y CD8+) y por células NK, aunque se ha visto que linfocitos B, células NKT y células presentadoras de antígeno (CPAs) también secretan IFN- γ (revisado en Schroder et al., 2004). Se considera que la secreción de IFN- γ por las células NK tiene un papel importante en la defensa temprana contra una infección, mientras que la secreción por parte de los linfocitos T es importante durante la respuesta inmunitaria adaptativa. La producción de IFN- γ está regulada positivamente por citoquinas secretadas por las CPAs, mayoritariamente IL-12 e IL-18 (Magram et al., 1996; Pien et al., 2000). En cambio, IL-4, IL-10, TGF β (*transforming growth factor beta*) y los glucocorticoides ejercen efectos negativos sobre la producción de IFN- γ (Sen, 2001; Schindler et al., 2001).

El receptor de IFN- γ (IFNGR) está compuesto por dos cadenas de unión a ligando (IFNGR1) asociadas a dos cadenas adicionales (IFNGR2) (Figura 2) . Ambos tipos de cadena del IFNGR carecen de actividad quinasa propia. El dominio intracelular de IFNGR1 contiene motivos de unión para la quinasa Jak1 y el factor de transcripción Stat1, mientras que la región intracelular de IFNGR2 contiene motivos de unión para Jak2. Tras la unión del ligando, los dominios de las cadenas del receptor experimentan un cambio conformacional que permite la asociación con las moléculas Jak1 y 2. La unión del ligando induce la autofosforilación de Jak2 y su activación, lo cual permite que Jak2 fosforile a Jak1 (Igarashi et al., 1994). Jak1 activado fosforila los residuos tirosina-440 de las cadenas IFNGR1 que se convierten en lugares de unión para proteínas que contienen dominios SH2, incluyendo Stat1 (Heim and Kerr, 1995). Stat1 es entonces fosforilado en la tirosina-701, dimeriza con otra molécula Stat1 y transloca al núcleo. Stat1 también se fosforila en la serina-727 durante la fase temprana de activación, esta fosforilación es esencial para que la actividad transcripcional de Stat1 sea máxima (Wen et al., 1995). Ambas fosforilaciones requieren la activación de la quinasa Jak2 (Zhu et al., 1997). El homodímero de Stat1 entra al núcleo y se une al promotor de los genes regulados por IFN- γ . Los homodímeros de Stat1 se unen al ADN en elementos GAS (*gamma interferon activated sequence*) de secuencia *consensus* TTCN(2-4)GAA. La regulación de la transcripción por parte de IFN- γ tiene lugar en dos oleadas, la primera de ellas dentro de los 15-30 minutos siguientes al tratamiento con IFN- γ . Muchos de los genes inducidos de manera temprana son factores de transcripción que participan en la siguiente oleada de regulación transcripcional. Stat1 forma complejos con factores de transcripción IRF (*Interferon regulatory factor*) entre ellos IRF1 inducido durante la primera oleada de activación transcripcional. Estos complejos se unen a elementos ISRE (*interferon-sensitive response element*) (secuencia *consensus* A/GNGAAANNGAAACT) y regulan gran parte de la transcripción de genes en respuesta a IFN- γ (revisado en Schroder et al., 2004)

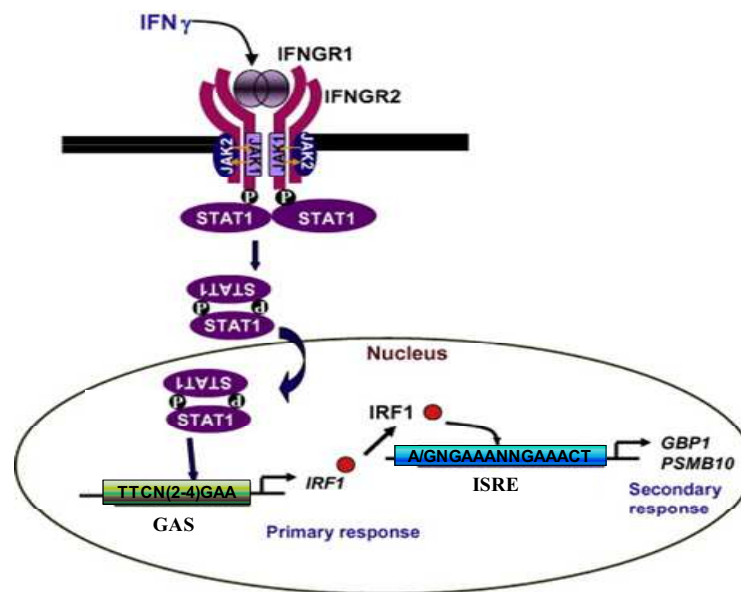


Figura 2.- Señalización de IFN- γ dependiente de Stat1 (basada en Saha et al., 2010). Tras la unión de IFN- γ a su receptor se activan las quinasas Jak1 y Jak2 que fosforilan a STAT1. Los homodímeros de STAT1 fosforilados se unen a elementos de respuesta GAS iniciando una primera tanda de activación transcripcional en la cual se inducen factores de transcripción como IRF1 que forman un complejo con STAT y reconocen elementos ISRE en los promotores de genes que se inducen de forma más tardía.

La activación de Stat1 por IFN- γ está regulada negativamente por la propia señalización de IFN- γ . Uno de los reguladores negativos mejor estudiados de la vía Jak-Stat son los supresores de la señalización por citoquina SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) que inhiben la actividad de Jak (Saha et al., 2010). Además, las fosfatasa SHP (*SH2 domain-containing tyrosine phosphatase*)-1 y -2 también regulan negativamente la vía de IFN- γ mediante la desfosforilación de Jak.

Aunque la respuesta biológica inducida por IFN- γ está mediada en gran parte por la vía Jak-Stat, IFN- γ también activa diversas proteínas de transducción de señal adicionales. Entre estas proteínas de transducción de señal se incluyen las MAPKs Pyk2 y ERK1/2, la quinasa de la familia Src Fyn, las proteínas adaptadoras c-Cbl, CrkL, CrkII y Vav y las moléculas de señalización asociadas a proteínas G C3G y Rap-1 (*Ras GTPase-activating protein 1*) (revisado en Ramana et al., 2002). Además, algunos genes importantes en la

respuesta antivírica mediada por IFN- γ son inducidos de forma independiente de Stat1 pero dependiente de Jak1 (Gil et al., 2001).

Funciones del IFN- γ

IFN- γ es capaz de activar a los macrófagos aumentando su actividad fagocítica y microbicida, además de incrementar la presentación de antígeno vía MHC I y II. El aumento de la actividad microbicida está mediado por un incremento del estallido respiratorio y la síntesis de NOS2, con la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, respectivamente. Además, el IFN- γ incrementa la respuesta del macrófago a otros estímulos inflamatorios, como los ligandos de los TLR, el TNF (*tumor necrosis factor*) y los interferones de tipo I, fenómeno que se ha denominado *priming*. Para el caso de los TLR, este *priming* consiste en un incremento de la expresión de mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas y quimioquinas, a través de un mecanismo que suele implicar la activación del factor de transcripción NF- κ B. Por otro lado, el *priming* de los macrófagos en respuesta a los interferones de tipo I se caracteriza por un incremento en la activación de Stat1 (Hu and Ivashkiv, 2009).

El IFN- γ estimula la inmunidad celular innata de las células NK, la inmunidad específica citotóxica (basada en el reconocimiento del antígeno asociado a las moléculas del MHC) y, sobretodo, la activación de los macrófagos (Boehm et al., 1997). La IL-12 es uno de los principales mediadores de la inmunidad celular. Es secretada, en respuesta a estimulación, por las células dendríticas, los neutrófilos y, sobretodo, por los macrófagos (Trinchieri, 1995). Su secreción por neutrófilos y macrófagos es inducida rápidamente por el LPS y otros productos derivados de microorganismos patógenos. El efecto del IFN- γ es el de potenciar la transcripción de la IL-12 en respuesta a estos estímulos. La IL-12 activa las células NK y es el principal mediador de la diferenciación de las células T *naïve* a células Th1. Por tanto, es un conector entre la inmunidad innata y la específica. La IL-12 induce la secreción de IFN- γ por las células T CD4+, las células NK, los monocitos y los macrófagos. Con ello se establece un sistema que se retroalimenta positivamente y mantiene el fenotipo Th1 (Yoshida and Koide, 1994).

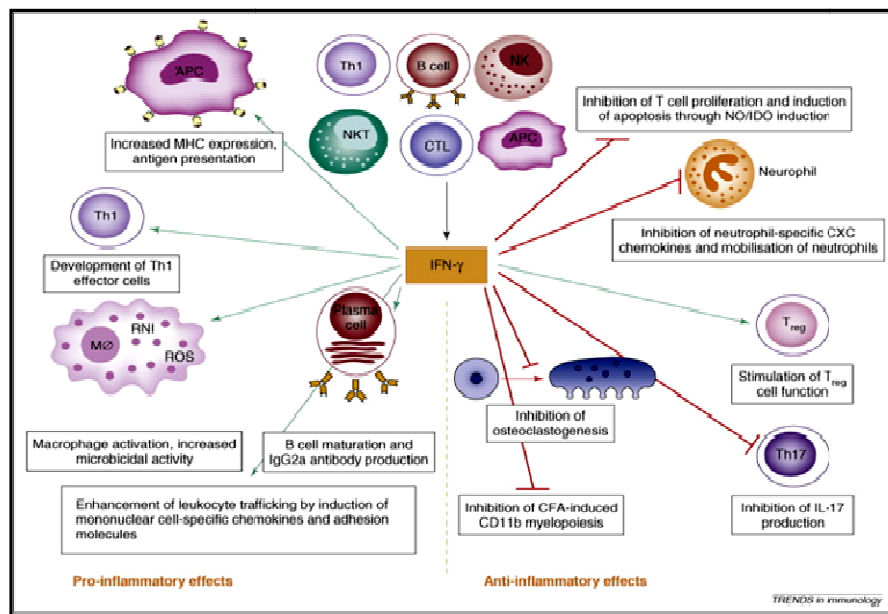


Figura 3.- Funciones de IFN- γ sobre el sistema inmunitario (Kelchtermans et al., 2008).

Por un lado, IFN- γ tiene un efecto proinflamatorio: aumenta la presentación de antígenos por parte de las APCs, induce el desarrollo de los linfocitos Th1 efectores, activa a los macrófagos e incrementa su actividad microbicida, aumenta la maduración de linfocitos B y promueve la producción de anticuerpos IgG2a y aumenta el tráfico leucocitario mediante la inducción de quimioquinas y moléculas de adhesión. Por otro lado, IFN- γ tiene un efecto antiinflamatorio: inhibe la proliferación de linfocitos T y aumenta la apoptosis mediante la inducción de NO eIDO, inhibe quimioquinas específicas de neutrófilos disminuyendo su movilización, estimula a los linfocitos T reguladores, inhibe la producción de IL-17 por parte de los linfocitos T, inhibe la osteoclastogénesis y la mielopoiesis.

Cuando un linfocito T virgen reconoce un antígeno presentado por una célula presentadora produce IL-2, citoquina que induce su proliferación. En esta etapa, el linfocito T pasa a un estadio intermedio de diferenciación conocido como Th0 que tiene capacidad de polarizarse hacia fenotipos Th1 o Th2. Que el linfocito se diferencie a Th1 o Th2 depende de señales que reciba el linfocito Th0 en el momento de reconocer el antígeno, la naturaleza del patógeno (intracelular o extracelular) y las citoquinas disponibles. La diferencia entre Th1 y Th2 estriba en el patrón de citoquinas que se producen tras la activación por el antígeno. El IFN- γ es el principal producto de las células Th1. En cambio, las células tipo Th2 secretan preferentemente IL-4 (Mosmann and Coffman, 1989; Seder and Paul, 1994). En general, las respuestas celulares

decantadas a Th1 se asocian a la defensa frente a patógenos intracelulares, sobretodo bacterias intracelulares y protozoos (Sher and Coffman, 1992; Reiner and Locksley, 1995). La IL-12 y el IFN- γ están implicados en la decisión de adoptar un fenotipo Th1. Además, el IFN- γ inhibe la vía IL-4-Stat6, necesaria para la diferenciación de la población Th2.

En los linfocitos B, el IFN- γ actúa para favorecer el cambio de isotipo a ciertas subclases de inmunoglobulinas (Ig)G con elevada capacidad opsonizante que son reconocidas por células fagocíticas mediante el receptor de la fracción constante de las IgGs (Fc γ R), sobretodo la IgG2a (Boehm et al., 1997).

El IFN- γ inhibe la diferenciación de los linfocitos Th17, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los linfocitos Th17 defienden al huésped contra bacterias extracelulares y levaduras y dan una respuesta que se caracteriza por la infiltración de neutrófilos y una destrucción potencial de tejidos. La diferenciación de estas células se produce por la IL-6, la IL-1, el TGF β (*transforming growth factor beta*), la IL-21 y la IL-23.

El IFN- γ es capaz de promover la diferenciación de los linfocitos T reguladores (T reg). Esta población sirve para restringir la activación de los linfocitos T efectores y para mantener la homeostasis (Hu and Ivashkiv, 2009).

a) Actividad antimicrobiana del IFN- γ

Uno de los principales efectos que tiene el IFN- γ sobre los macrófagos es el aumento de su actividad antimicrobiana. Esto se consigue mediante varios mecanismos como el aumento de la pinocitosis y de la fagocitosis mediada por receptores. El IFN- γ induce la NADPH-oxidasa de los fagocitos dando lugar al “estallido respiratorio” que conlleva un aumento del consumo de oxígeno y de la producción de especies reactivas de oxígeno con propiedades bactericidas (Gupta et al., 1992). Por otro lado, el IFN- γ induce la expresión de enzimas lisosomales que promueven la destrucción y eliminación de los microorganismos. El IFN- γ induce la argininosuccinato sintetasa (productora de L-arginina), la GTP-ciclohidroxilasa I (que proporciona el cofactor tetrahidrobiopterina requerido para la producción de NO) y la sintasa inducible de óxido nítrico (NOS2) (Macmicking et al., 1997). El NO y los

productos reactivos del nitrógeno que se producen por activación de NOS2 pueden penetrar fácilmente a través de la pared celular de las bacterias y atacarlas (Macmicking et al., 1997). Además, los oxidantes producidos por el estallido respiratorio pueden reaccionar con los productos reactivos del nitrógeno producidos por la NOS2, dando lugar a un elevado número de productos tóxicos con actividad bactericida (Radi and Beckman, 1991).

Por otra parte, el IFN- γ induce una depleción de triptófano. Esta depleción es un mecanismo importante tanto en la inhibición de la proliferación celular como en el control de parásitos como *Toxoplasma gondii* y *Chlamydia trachomatis*. El IFN- γ induce la expresión de las enzimas indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) y triptofanil-tRNA sintetasa (Burke and Knowles, 1995; Fleckner and Martensen, 1995). La IDO es la principal enzima responsable del catabolismo del triptófano. En la mayoría de los tipos celulares el principal producto de su actividad es la quineurina, mientras que en los macrófagos es el ácido antranílico. La inducción de la IDO ocurre paralelamente a la inducción de la GTP-ciclohidroxilasa I, enzima clave en la síntesis de la pteridina, de manera que la disminución de los niveles de triptófano se acompañan siempre de un acúmulo de neopterina y tetrahidrobiopterina, cofactor que regula la síntesis de NO a partir de arginina durante la activación (Taylor, 1991).

El IFN- γ también aumenta la fagocitosis mediante la inducción de la expresión del receptor de elevada afinidad de IgG, Fc γ RI, en la superficie de los fagocitos mononucleares y células NK (Erbe et al., 1990), de la secreción de factores del complemento y de la expresión en superficie de sus receptores.

b) Actividad antivírica del IFN- γ

Los mecanismos por los cuales el IFN- γ induce un estado antivírico incluyen la inducción de enzimas antivíricos, destacando entre ellos la proteína quinasa activada por ARN (PKR), la 2',5'-oligoadenilato sintetasa (OAS), la RNasa L, la adenosina deaminasa específica de ARN (ADAR) y las proteínas GTPasas Mx.

La PKR es una serina/treonina quinasa inducida en gran cantidad por los interferones de tipo I y de tipo II (Meurs et al., 1990; Beretta et al., 1996). El ARN de doble cadena, intermediario en la replicación de los virus de ARN, activa la autofosforilación y activación de la PKR. Entre los sustratos celulares

fosforilados por la PKR destaca la subunidad eIF-2 α del complejo elongador de la traducción proteica, cuya fosforilación es inactivadora. Por tanto, la PKR inhibe la síntesis proteica tanto celular como vírica (Meurs et al., 1990). Otras funciones de la PKR son la regulación de la expresión del TNF α , la inducción de la apoptosis mediada por Fas, y el control de la activación de factores de transcripción como NF- κ B y Stat1 (García et al., 2006).

La enzima OAS cataliza la conversión de ATP en 2',5'-oligoadenilatos que a su vez activan a la RNasa L, capaz de degradar ARN de cadena simple, inhibir la síntesis proteica y el crecimiento vírico (Samuel, 2001).

c) Regulación del tráfico leucocitario

El IFN- γ regula la extravasación de los leucocitos a los lugares de inflamación mediante el aumento de la expresión de determinadas moléculas de adhesión en la superficie de estas células. Además, el IFN- γ y el NO causan la vasodilatación de los vasos sanguíneos, disminuyendo la presión sanguínea y facilitando el proceso de extravasación (Boehm et al., 1997).

Entre las moléculas inducidas por el IFN- γ se encuentran las quimioquinas que actúan como atrayentes de leucocitos hacia el tejido inflamado, como son la proteína inducible por interferón Cxcl10 (*chemokine (C-X-C motif) ligand 10*), la proteína quimiotáctica de monocitos Ccl2 (*chemokine (C-C motif) ligand 2*), la monoquina inducida por IFN- γ Cxcl9, las proteínas inflamatorias de macrófagos Ccl3 y Ccl4 y la molécula Ccl5. También se inducen la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 (*intercelular adhesión molecule-1*) y la molécula de adhesión vascular VCAM-1 (*vascular cell adhesión molecule-1*). En la regulación de la expresión de todas estas moléculas por el IFN- γ suelen participar también factores como el TNF α y la IL-1 β , produciéndose una inducción sinérgica (Boehm et al., 1997).

A la vez, el IFN- γ regula negativamente quimioquinas atrayentes de neutrófilos, como Cxcl2 y Cxcl5 (Kelchtermans et al., 2008).

d) Regulación de la presentación de antígenos.

Tanto los interferones de tipo I como los de tipo II incrementan la actividad de la vía de presentación de antígeno por el MHC de clase I y aumentan la calidad y diversidad de péptidos presentados en la superficie celular.

La estimulación con IFN- γ induce el recambio de subunidades constitutivas del proteasoma por subunidades del llamado “inmunoproteasoma”. En las células no estimuladas, las subunidades enzimáticas del proteasoma son la β_1 , β_2 y β_5 , codificadas fuera del locus de los genes del MHC. El IFN- γ induce la expresión de nuevas subunidades, llamadas *large multifunctional protease 2* (LMP2), *multicatalytic endopeptidase complex subunit-1* (MECL-1) y LMP-7, que por competición desplazan a las subunidades β_1 , β_2 y β_5 , respectivamente (Groettrup et al., 2001). Este recambio inducible de las subunidades del proteasoma se considera un mecanismo por el cual el IFN- γ aumenta la cantidad, calidad y repertorio de los péptidos que se cargan en el contexto del MHC de clase I. Este mecanismo podría haber evolucionado para asegurar que los péptidos dependientes de LMP2, MECL-1 y LMP7 solamente se produzcan en los lugares de inflamación, evitando la autoinmunidad (Groettrup et al., 2001). El IFN- γ también aumenta la eficiencia de generación de péptidos mediante la inducción de la proteína activadora del proteasoma PA28, formada por las subunidades PA28 α y PA28 β , que se asocian al proteasoma y modifican su actividad proteolítica (Dick et al., 1996; Groettrup et al., 1996).

Finalmente, el complejo del MHC de clase I, que está formado por una cadena pesada y una cadena ligera (o β_2 -microglobulina), está en sí mismo inducido por el IFN- γ (Fellous et al., 1982; Wallach, 1982; Johnson and Pober, 1990). También moléculas tipo chaperonas, implicadas en el correcto ensamblaje de los péptidos al MHC de clase I, como la tapasina o la proteína GP96 (*tumour rejection antigen 96*), se ha demostrado que son inducibles por el IFN- γ (Anderson et al., 1994; Suto and Srivastava, 1995). Además, el transportador asociado al procesamiento de antígeno TAP (*transporter associated with antigen processing*), que transporta los péptidos desde el citosol al lumen del retículo endoplasmático y que interacciona transitoriamente con las moléculas del MHC de clase I para su eficiente carga de péptidos, está formado por subunidades inducidas por el IFN- γ (Brucet et al., 2004).

Por otro lado, de todos los interferones, solamente el IFN- γ puede aumentar eficientemente la presentación de antígeno por el MHC de clase II e inducir la activación de las células T colaboradoras (CD4⁺). Las células presentadoras de antígeno son capaces de internalizar, degradar y posteriormente expresar en su superficie pequeños fragmentos antigénicos provenientes de patógenos

extraños. Esta presentación se produce por las moléculas del MHC de clase II, que son capaces de interactuar con el receptor del linfocito T en la superficie de los linfocitos T CD4+. La activación del linfocito T colaborador da lugar a diferentes respuestas con el fin de eliminar al patógeno. Estas respuestas incluyen la proliferación y adquisición de funciones efectoras de los linfocitos T, la estimulación de la producción de anticuerpos por los linfocitos B y la generación de la memoria inmunológica (Berger and Roche, 2009). Por un lado, el IFN- γ incrementa los niveles de expresión del MHC de clase II en células que ya lo expresan constitutivamente como son los linfocitos B, las células dendríticas y los macrófagos, es decir, células presentadoras de antígeno profesionales. Por otro lado, también induce el MHC de clase II en células presentadoras no profesionales, como son las células endoteliales vasculares y determinadas células epiteliales y mesenquimatosas, que no expresan MHC de clase II en estado basal (Mach et al., 1996). El IFN- γ consigue aumentar el número de complejos MHC II-péptido en la superficie celular, no sólo induciendo la expresión del propio MHC de clase II, sino también la de moléculas críticas como la cadena invariante Ii (Cresswell, 1994; Chang, 1995), las catepsinas B, H y L, las proteasas lisosómicas implicadas en la producción de péptidos antigénicos (Lafuse et al., 1995; Lah and Hawley, 1995) y la molécula HLA-DM, un regulador de la accesibilidad del péptido al surco del MHC II (Chang, 1995; Kern and Steimle, 1995). El transactivador de clase II o *Class II transactivator* (CIITA) media el control transcripcional de manera coordinada de todos estos genes, y es inducible por el IFN- γ (Chang and Fontes, 1994). El CIITA funciona como un gatillo que activa rápidamente la expresión del MHC de clase II y los genes relacionados con su función, tras el estímulo del IFN- γ .

e) Regulación del ciclo celular, del crecimiento y de la apoptosis

Uno de los fenómenos más fácilmente observables causados por el IFN- γ en los macrófagos es la inhibición de la proliferación celular. En general, los interferones bloquean el avance del ciclo celular en el checkpoint de G₁/S, aunque se ha sugerido que este bloqueo podría ser debido en realidad a una salida del ciclo hacia G₀ (Tiefenbrun et al., 1996).

El IFN- γ inhibe la proliferación celular principalmente a través de la inducción de los niveles de proteínas de la familia Ink4 y otros CDKIs, como p21WAF1

(*wild-type p53-activated factor*) y p27 (también llamada *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* o CDKN1B) (Mandal and Bandyopadhyay, 1998). La inducción de estos factores causa un bloqueo de la progresión del ciclo celular, concretamente en la frontera entre G₁ y S del ciclo celular.

En los macrófagos, la apoptosis puede ser necesaria para evitar la propagación de los patógenos intracelulares. Sin embargo, algunos patógenos causan la muerte de la célula huésped induciendo la secreción de toxinas específicas del macrófago. Existe cierta controversia sobre los efectos de IFN- γ en el proceso de apoptosis. Existen evidencias de que el IFN- γ previene la apoptosis de los macrófagos inducida por diversos estímulos y se ha demostrado que este efecto protector está mediado por p21 (Asada et al., 1999; Xaus et al., 1999). No obstante, IFN- γ también puede tener un papel proapoptótico mediante la inducción del gen supresor de tumores IRF1. La inducción de apoptosis por señales como el daño genético requiere de la expresión de IRF1. Los niveles de IRF1 pueden ser, por tanto, un factor decisivo en la inducción o protección de la apoptosis en las células tratadas con IFN- γ . Se ha propuesto que las células tratadas con IFN- γ que presentan altos niveles de IFNGR producen niveles elevados de IRF1 capaces de inducir apoptosis. En cambio, el tratamiento con IFN- γ de células con niveles bajos de expresión de IFNGR produce niveles de IRF1 menores insuficientes para inducir apoptosis (Bernabei and Coccia, 2001).

Los efectos proapoptóticos causados por el factor IRF1 están mediados mayoritariamente por la inducción de la caspasa 1 (o enzima convertidor de la IL1 β) (Miura and Zhu, 1993). La caspasa 1 es una cisteína proteasa implicada en mediar la apoptosis de los macrófagos por varios estímulos, como el LPS (Mathiak et al., 2000). El IFN- γ induce muchas otras moléculas proapoptóticas, como la PKR, las DAPs (*death associated proteins*), la catepsina D y las moléculas de membrana Fas y el receptor del TNF α .

1.4. IFN- γ , activación de las células de microglía y neuroinflamación

Las células de microglía son macrófagos residentes en el sistema nervioso central (Benveniste, 1997). Colonizan este tejido poco después del nacimiento, antes de que se establezca la barrera hematoencefálica (Hickey et al., 1992). Durante la remodelación del cerebro y su maduración, la microglía ayuda a la

eliminación de células que han entrado en apoptosis. En el cerebro maduro y bajo condiciones fisiológicas normales, la microglía tiene un papel de vigilancia inmune y defensa del huésped (revisado en Block & Hong, 2005). Sin embargo, junto a los astrocitos también residentes en el sistema nervioso central, estas células son especialmente sensibles a cambios en su microambiente y rápidamente se activan en respuesta a una infección o herida (Liu et al., 2003). La mayoría de factores liberados por la microglía activada son proinflamatorios y neurotóxicos. Aunque la activación de la microglía no implica daño neuronal su respuesta desregulada o una sobre-activación pueden tener importantes consecuencias neurotóxicas (Block and Hong, 2005). Cada vez existen más evidencias del papel clave de la activación de la microglía en los desórdenes neurodegenerativos y, por ello, su regulación es importante para combatir estas enfermedades (revisado en McCarty, 2006).

En el sistema nervioso central, el IFN- γ activa a las células de microglía y aumenta la expresión de moléculas de adhesión importantes para la extravasación de leucocitos y su infiltración hacia el cerebro. La fuente más obvia de IFN- γ en el sistema nervioso inflamado viene proporcionada por la actividad de linfocitos T o de células natural killer (revisado en Owens, 2002). No obstante, existen evidencias de que bajo condiciones inflamatorias las propias células de microglía pueden producir IFN- γ (De Simone et al., 1998), el cual actuaría retroactivamente sobre dichas células y sobre los astrocitos para producir su activación.

Los niveles de IL-12 e IFN- γ están aumentados en el fluido cerebro-espinal y los tejidos del sistema nervioso central en pacientes con esclerosis múltiple y en modelos animales de encefalomiелitis experimental aguda (EAE) (revisado en Owens, 2002). En pacientes con enfermedad de Parkinson también se han encontrado niveles más elevados de IFN- γ en plasma (Mount et al., 2007).

No obstante, el papel del IFN- γ en enfermedades del sistema nervioso central es complejo. En ensayos clínicos, la administración de IFN- γ por inyección intravenosa en pacientes con esclerosis múltiple provocó un aumento de la tasa de recaída (Panitch et al., 1987). Sin embargo, en el modelo murino de EAE, el bloqueo de IFN- γ o su receptor provoca un empeoramiento de la progresión de la enfermedad en la mayoría de los casos (Owens et al., 2001). En estudios en los que se ha administrado IFN- γ por vía intravenosa a ratones

en el momento de la inducción de la EAE (Billiau et al., 1988) o tras la iniciación de la misma (Voorthuis et al., 1990) se consiguió bloquear la enfermedad, lo que indica que el IFN- γ podría tener un papel protector en este modelo. Sin embargo, la administración de IFN- γ directamente en el cerebro o la médula espinal es capaz de provocar una respuesta inflamatoria (Sethna and Lampson, 1991; Simmons and Willenborg, 1990) y en un modelo animal de enfermedad de Parkinson, el IFN- γ participa en la muerte de neuronas dopaminérgicas mediante la activación de células de microglía (Mount et al., 2007). En estudios independientes, la delección genética de IFN- γ bloqueó la activación de las células de microglía y confirió protección contra los efectos tóxicos de un pesticida sobre las neuronas dopaminérgicas (Mangano et al., 2011) y la sobreexpresión de IFN- γ en el sistema nervioso central de ratones normales condujo a un fenotipo caracterizado por una extensiva actividad de células de microglía y astrocitos, la calcificación de los ganglios basales y una degeneración progresiva de neuronas nigrostriatales (Chakrabarty et al., 2011). Así, pues, es posible que el resultado final de la administración o elevación de los niveles de IFN- γ dependa de su lugar de acción y que los efectos reguladores del IFN- γ en el modelo de EAE reflejen la acción de esta citoquina en la periferia en vez de en el sistema nervioso central. En general, la mayor parte de trabajos indican importantes acciones proinflamatorias y efectos neurotóxicos por parte del IFN- γ en el sistema nervioso central.

1.5 Macrófagos y homeostasis lipídica

Además de su implicación en la respuesta inmunitaria, los macrófagos ejercen un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis lipídica. En condiciones normales, los macrófagos mantienen una elevada actividad *scavenger* (basurero) que se traduce en la internalización de lipoproteínas de baja densidad (LDL) a través de receptores de LDL. Tras la internalización, las partículas de LDL son degradadas en el compartimento lisosomal, donde los enzimas hidrolíticos generan colesterol y ácidos grasos a partir de ésteres de colesterol. El colesterol libre es tóxico para las células y necesita ser reesterificado en ésteres de colesterol para su almacenamiento en el citoplasma. Existe un equilibrio dinámico entre la cantidad de colesterol libre y ésteres de colesterol en la célula, la cual está regulada por dos tipos de

enzimas localizados en el retículo endoplasmático, la acyl-coenzyma A:colesterol acyltransferasa-1 (ACAT1) y las hidrolasas neutras de ésteres de colesterol (revisado en Li and Palinski, 2006). En condiciones normales, el colesterol libre y los fosfolípidos son movilizados hacia la membrana plasmática mediante la acción de transportadores de la familia ABC (*ATP-binding cassette*), incluyendo a ABCA1 y ABCG1. A continuación dichos lípidos son transferidos a apolipoproteínas aceptoras exógenas que forman parte de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Este proceso se conoce como eflujo de colesterol y constituye el primer paso en el transporte reverso de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado (ver también apartado “LXR en la regulación del metabolismo”).

Cada uno de los constituyentes lipídicos de las partículas de LDL, incluyendo los ésteres de colesterol, los fosfolípidos, los esteroides y los triglicéridos, pueden experimentar oxidación y generar partículas LDL oxidadas (oxLDL) (revisado en (Valledor et al., 2010). Bajo condiciones que provocan la acumulación de oxLDL u otras formas modificadas de LDL, los macrófagos se vuelven muy eficientes en la internalización de dichas partículas gracias a la intervención de los receptores *scavenger* CD36, SR-A y SR-BI, moléculas que han evolucionado como receptores de patrones moleculares que median la fagocitosis de patógenos y de células apoptóticas (revisado en Hazen, 2008). La acumulación de derivados de LDL dentro de los macrófagos inhibe la expresión en superficie de los receptores clásicos de LDL, pero no de los receptores *scavenger* (Brown and Goldstein, 1986), lo que hace que los macrófagos puedan ser capaces de acumular grandes cantidades de lípidos derivados de partículas oxLDL y convertirse en células espumosas cargadas de lípidos (Nestel et al., 2012; Li and Glass, 2002; Eckardstein, 2001). Las células espumosas están presentes y participan activamente en todos los estadios de la formación y progresión de la aterosclerosis, una enfermedad cardiovascular que se caracteriza por la formación de placas de tejido fibroso (placas de ateroma) y el consiguiente engrosamiento de la pared arterial.

2. RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares son factores de transcripción dependientes de ligando que modulan procesos relacionados con el metabolismo, desarrollo,

proliferación e inflamación mediante la regulación positiva y negativa de la expresión génica a nivel transcripcional. El genoma humano y el de ratón codifican para 48 y 49 receptores nucleares, respectivamente.

Los diferentes miembros de la familia de los receptores nucleares se clasifican tradicionalmente en 3 grupos: receptores “Clásicos” que agrupan a aquellos miembros con ligandos endógenos conocidos (son típicamente receptores endocrinos como los receptores de estrógenos o de hormonas tiroideas), receptores “Huérfanos” que son aquellos cuyos ligandos son desconocidos y los receptores “Huérfanos adoptados” que fueron identificados antes de conocer a sus ligandos reguladores (Kliwer et al., 1999) (Figura 4A).

En general, la superfamilia de receptores nucleares comparte una estructura común caracterizada por un dominio central de unión al ADN (DBD; *DNA-binding domain*) y un dominio de unión a ligando (LBD; *ligand-binding domain*) en posición carboxi (C)-terminal (Mangelsdorf et al., 1995) (Figura 4B). El DBD consta de dos dedos zinc y es responsable de la especificidad de unión a secuencias del ADN conocidas como HRE (*Hormone response element*). El LBD está conectado al DBD mediante un dominio bisagra flexible. El LBD confiere la especificidad de unión a ligando de cada receptor. Por otro lado, el dominio LBD también contribuye a la homo/heterodimerización del receptor. Además los receptores nucleares contienen dos dominios con función activadora (AF; *activation function*): AF-1 situado en el extremo amino(N)-terminal y AF-2 en el extremo C-terminal (Evans, 1988). El dominio AF-2 es el responsable de la interacción de los receptores nucleares con moléculas coreguladoras.

Los receptores nucleares regulan la expresión génica en respuesta a ligando. El mecanismo de regulación de la transcripción se basa en la interacción entre los receptores nucleares y coreguladores asociados con la maquinaria transcripcional. Los coreguladores pueden inducir (coactivadores) o reprimir (corepresores) la transcripción génica (Hsia et al., 2010). De forma simplificada, los complejos corepresores acostumbran a estar unidos al receptor nuclear en ausencia de ligando y son reemplazados por complejos de coactivadores en presencia de ligando para activar así la maquinaria transcripcional (Nagy et al., 1999).

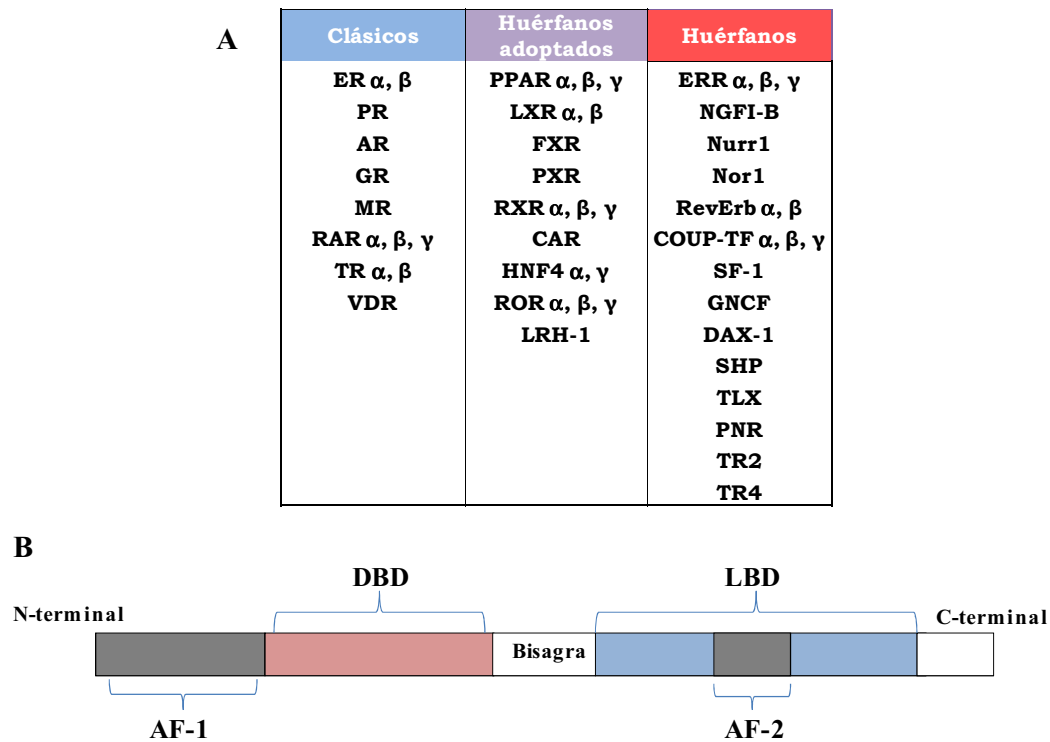


Figura 4.- Clasificación y estructura básica de la superfamilia de receptores nucleares. A) Los receptores nucleares clásicos incluyen: ER (*estrogen receptor*), PR (*progesterone receptor*), AR (*androgen receptor*), GR (*glucocorticoid receptor*), MR (*mineralocorticoid receptor*), RAR (*retinoic acid receptor*), TR (*thyroid hormone receptor*) y VDR (*vitamin D receptor*). Forman parte de los receptores huérfanos adoptados: PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), LXR (*liver X receptor*), FXR (*farnesoid X receptor*), PXR (*pregnane X receptor*), RXR (*retinoid X receptor*), CAR (*constitutive androstane receptor*), HNF4 (*hepatocyte nuclear factor 4*), ROR (*RAR-related orphan receptor*) y LHR-1 (*liver receptor homolog-1*). Son receptores huérfanos: ERR (*estrogen-related receptor*), NGFI-B (*nerve growth factor 1B-like receptor*), Nurr1, Nor1, RevErb, COUP-TF (*COUP Transcription Factor*), SF-1 (*steroidogenic factor-1*), GNCF (*germ cell nuclear factor*), DAX-1 (*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*), SHP (*small heterodimer partner*), TLX (*tailless homolog*), PNR (*photoreceptor cell-specific nuclear receptor*), TR2 (*testicular receptor 2*), TR4 (*testicular receptor 4*). B) La estructura básica de los receptores nucleares se basa en un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de unión a ligando (LBD) conectados a través de un dominio bisagra flexible. Además, los receptores nucleares contienen dos dominios con función activadora (AF)-1 y -2.

Por otro lado, los receptores nucleares también regulan negativamente la expresión génica mediante un fenómeno colectivamente denominado transrepresión (que se explicará en profundidad más adelante), que implica una interacción de los receptores nucleares con otras proteínas unidas a los

promotores de los genes transreprimidos, más que una interacción directa con el ADN (Glass and Ogawa, 2006).

2.1. Liver X Receptor (LXR)

Los *Liver X receptors* (LXRs) son miembros de la superfamilia de receptores nucleares y están activados por formas oxidadas de colesterol (oxisteroles), incluyendo 22-(R)-, 24-(S)-, 25- y 27-hidroxicolesterol y 24-(S),25-epoxicolesterol (Janowski et al., 1996; Forman et al., 1997; Lehmann et al., 1997). Además se han desarrollado potentes ligandos sintéticos para LXR como TO901317 y GW3965 (Schultz et al., 2000; Collins et al., 2002), ampliamente utilizados en el estudio de las funciones biológicas de LXR. Se han identificado dos isoformas de LXR, LXR α (NR1H3) y LXR β (NR1H2), codificadas por genes diferentes y con un porcentaje de similitud en su secuencia superior al 75% en sus DBD y LBD. Las isoformas de LXR tienen distintos patrones de expresión, LXR α se expresa en hígado, tejido adiposo, riñón, intestino, bazo y macrófagos mientras LXR β está distribuido de forma ubicua. Ambas isoformas requieren heterodimerización con el receptor nuclear RXR (*Retinoid X Receptor*) para activar la transcripción de sus genes diana. El heterodímero LXR/RXR reconoce elementos de respuesta en el promotor de sus genes diana que se conocen como LXRE (*LXR response element*) y que, generalmente, se disponen en forma de repeticiones directas separadas por cuatro nucleótidos. La secuencia *consensus* es (G/T/A)G(G/T)T(C/T)Annnn(C/A/T)G(G/T)(T/G)CA (Edwards et al., 2002), donde n es cualquier nucleótido. En ausencia de ligando el heterodímero LXR/RXR reprime activamente la expresión de algunos de sus genes diana mediante la asociación con los corepresores NCoR (*nuclear receptor corepressor*) y SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*) (Chen and Evans, 1995; Hörlein et al., 1995).

Se han documentado diversas modificaciones post-transcripcionales para LXR, incluyendo acetilación, ubiquitinación (Li et al., 2007; Kim et al., 2009), fosforilación (Chen et al., 2006; Yamamoto et al., 2007; Torra et al., 2008), O-Glc-NAcilación (Anthonisen et al., 2010) y sumoilación (Ghisletti et al., 2007; Venteclef et al., 2010).

LXR regula la expresión de genes implicados en distintos procesos fisiológicos como el metabolismo lipídico, el metabolismo de la glucosa, la proliferación celular o la inflamación.

LXR en la regulación del metabolismo

LXR regula diversos aspectos del metabolismo lipídico mediante la inducción de diversos genes diana. LXR induce la expresión de varios transportadores de esteroides de la familia ABC (*ATP-binding cassette*) con funciones esenciales en el transporte reverso de colesterol (ABCA1 y ABCG1) (Repa et al., 2000; Venkateswaran et al., 2000), la excreción de esteroides en forma de ácidos biliares en las heces y la disminución de la absorción intestinal de esteroides (ABCG5/ABCG8) (Baldán et al., 2009; Lee et al., 2001; Lu et al., 2001; Repa et al., 2002; Yu et al., 2003). ABCA1 está implicado en la transferencia de colesterol a apolipoproteínas aceptoras pobres en lípidos como ApoAI (Oram and Vaughan, 2000). La mutación de ABCA1 en humanos da lugar a la enfermedad de Tangier, un trastorno que se caracteriza por una ausencia de lipoproteínas de alta densidad (HDL; *high density lipoprotein*) en plasma y por la acumulación de colesterol en los macrófagos residentes en los tejidos (Rust et al., 1999; Lawn et al., 1999; Brooks-Wilson et al., 1999; Bodzioch et al., 1999). Los pacientes afectados de esta enfermedad mueren a edades tempranas a causa de enfermedades vasculares incluyendo la aterosclerosis. Los agonistas de LXR inducen la expresión de ABCA1 no sólo en macrófagos sino en múltiples tipos celulares (Repa, 2000a). ABCG1 participa junto a ABCA1 en el transporte reverso de colesterol promoviendo el flujo de colesterol hacia HDL (Wang et al., 2004; Kennedy et al., 2001). Además, ABCG1 actúa como un transportador intracelular y se localiza en vesículas endocíticas, a diferencia de ABCA1 ubicado en la membrana plasmática (Tarling and Edwards, 2011).

Además de promover el transporte reverso de colesterol, LXR limita la incorporación de colesterol por parte de las células mediante la inducción de Idol (*inducible degrader of the LDL receptor*), una E3 ubiquitin ligasa que induce la degradación de varios miembros de la familia de receptores de

lipoproteínas de baja densidad (LDL; *low density lipoprotein*) (Zelcer et al., 2009). De esta manera LXR limita la entrada de colesterol en las células.

Los LXRs también inducen la expresión de otras moléculas que participan en la homeostasis de lipoproteínas (revisado en Ricote, Valledor, & Glass, 2004) como la proteína PLTP (*phospholipid transfer protein*) que transfiere fosfolípidos de lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL; *very low-density lipoprotein*) a HDLs (Cao et al., 2002) o la lipasa LPL (*lipoprotein lipase*) que hidroliza triglicéridos de las VLDLs (Y Zhang, J J Repa, Gauthier, & D J Mangelsdorf, 2001), además de inducir la expresión de las Apolipoproteínas E (Laffitte et al., 2001), CI, CII y CIV (Mak et al., 2002) capaces de actuar como aceptores para colesterol y enzimas remodeladoras de lipoproteínas.

De forma conjunta, los LXRs actúan como sensores de formas oxidadas de colesterol capaces de mantener la homeostasis del colesterol a través de las diferentes funciones reguladas por LXR (disminución de la entrada de colesterol en las células, aumento del transporte reverso de colesterol y de la excreción de colesterol en forma de ácidos biliares y limitación de la absorción intestinal) (Figura 5).

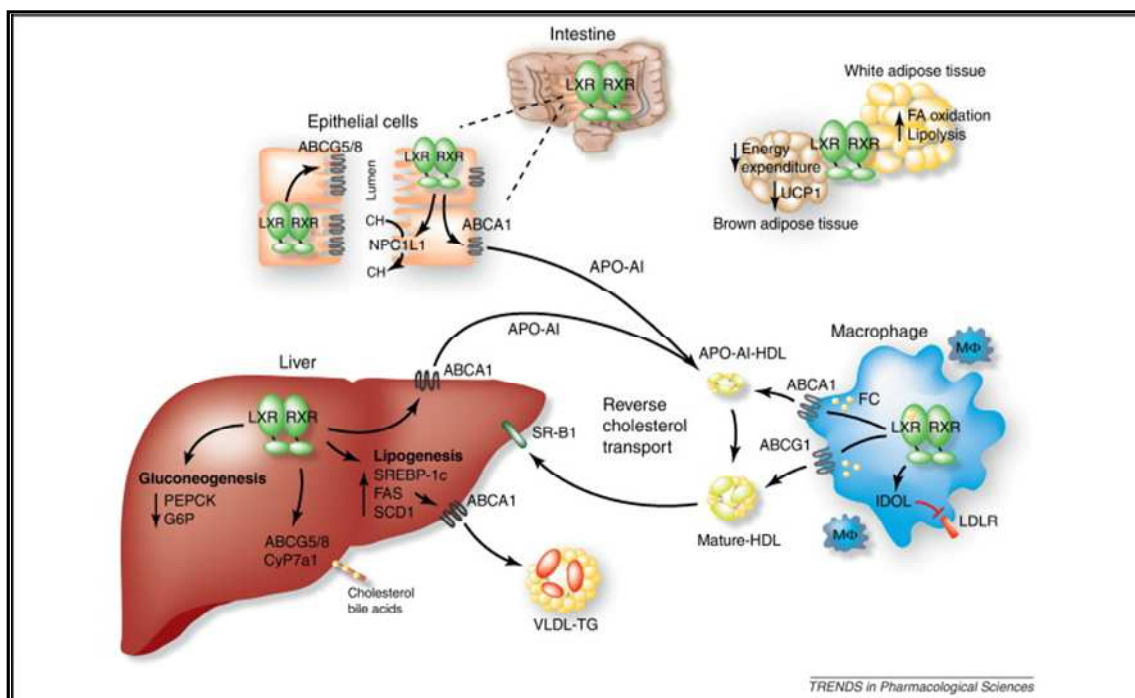


Figura 5.- Papel de los LXRs en el metabolismo lipídico (Jakobsson et al., 2012). Los LXRs regulan la lipogénesis hepática aumentando la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos a través de la inducción de los factores de transcripción Srebp1c y Chrebp. SREBP1c y ChREBP,

a su vez, regulan otros genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos su esterificación. LXR también reduce la expresión de enzimas implicados en la gluconeogénesis hepática (como la glucosa-6-fosfatasa) y PEPCK. En macrófagos, LXR aumenta la expresión de los transportadores de colesterol ABCA1 y ABCG1, aumentando así el flujo reverso de colesterol mediado por macrófagos. En el hígado, LXR promueve la excreción de colesterol vía ABCG8/5 y su conversión en ácidos biliares. Por otro lado, LXR induce la expresión de Idol, un regulador negativo de LDL-R, lo cual implica una reducción en la entrada de colesterol en las células.

Por otro lado, los LXRs promueven la lipogénesis hepática mediante la inducción de los factores de transcripción SREBP1c (*sterol regulatory element-binding protein 1c*) y ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*). Ambos factores de transcripción, SREBP1c y ChREBP, controlan la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos y su esterificación (Schultz et al., 2000, Cha & Joyce J Repa, 2007).

Los LXRs también participan en la regulación del metabolismo de la glucosa. En el hígado, los ligandos de LXR reprimen la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis, incluyendo el coactivador PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α*), la quinasa PEPCK (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*) y la glucosa-6-fosfatasa e inducen la expresión de glucoquinasa, promoviendo la utilización de la glucosa. En el tejido adiposo, LXR regula positivamente la expresión del transportador de glucosa GLUT4 (*insulin-responsive glucose transporter 4*), promoviendo la incorporación de glucosa (Laffitte et al., 2003).

LXR en la regulación de la proliferación

Diversos grupos han demostrado la capacidad de los agonistas de LXR de ejercer acciones antiproliferativas en varios tipos celulares, incluyendo células vasculares de la musculatura lisa (Blaschke et al., 2004), células de cáncer humano (Fukuchi et al., 2004b; Chuu et al., 2007; Vedin et al., 2009), linfocitos T (Geyerregger et al., 2009; Bensinger et al., 2008) y hepatocitos (Lo Sasso et al., 2010).

Los mecanismos involucrados en la inhibición de la proliferación celular mediada por LXR están siendo objeto de estudio y parecen ser divergentes en distintos tipos celulares.

En linfocitos T murinos, los agonistas de LXR inhiben la proliferación en respuesta a mitógenos o antígenos mediante un mecanismo que requiere de la expresión funcional de ABCG1, el cual sugiere que la reducción del contenido celular de colesterol o una redistribución del mismo dentro de la célula podría ser interpretado por las células como una señal de parada del ciclo celular. De hecho, estos estudios revelaron que la vía de LXR estaba regulada negativamente durante la proliferación de células T (Bensinger et al., 2008). En linfocitos T humanos, se ha observado que LXR interfiere en la proliferación en respuesta a IL-2 e IL-7 mediante la inhibición de la fosforilación de la proteína represora pRb y la disminución de la expresión de la ciclinaB (Geyeregger et al., 2009). En otros tipos celulares se ha descrito también una disminución de la fosforilación de pRb en respuesta al tratamiento con agonistas de LXR. El mecanismo mediante el cual LXR disminuye la fosforilación de pRb en algunos tipos celulares se basa en la disminución de la expresión de la proteína SKP2 (*S phase kinase-associated protein 2*) (Blaschke et al., 2004; Chuu et al., 2007). SKP2 es una proteína involucrada en la degradación del inhibidor de ciclo celular p27^{KIP1}, que a su vez inhibe a la quinasa responsable de la fosforilación de pRb (CDK4).

Por otro lado, Yusa et al. (1999) mostraron que una diana de LXR, el inhibidor de apoptosis secretado por macrófagos AIM (también conocido como SP α), en combinación con TGF β 1 es capaz de reprimir la proliferación celular de linfocitos B.

LXR en la regulación de la inflamación

Los agonistas de LXR reprimen la expresión de determinados genes inflamatorios mediante un proceso conocido como transrepresión, que también comparten otros receptores nucleares (revisado en Glass & Ogawa, 2006).

Los agonistas de LXR son capaces de transreprimir vías de señalización inflamatorias activadas por LPS (vía TLR4), IL-1 β , TNF α , ácido poliinosínico-policitidílico (vía TLR3) o IFN- γ (Ghisletti et al., 2007; Joseph et al., 2003; Lee et al., 2009). Sin embargo, la transrepresión mediada por LXR no afecta a todos los genes inducidos por estas vías. Los mecanismos subyacentes a estos

efectos específicos de promotor, de estímulo y quizás de tipo celular son todavía objeto de estudio (revisado en Pascual-García & Valledor, 2012).

Estudios iniciales en macrófagos murinos mostraron que la transrepresión mediada por LXR de la vía del LPS afectaba negativamente a la señalización del factor nuclear (NF)- κ B, pero no a la de la proteína activadora-1 (AP-1; *activating protein-1*) (Joseph et al., 2003).

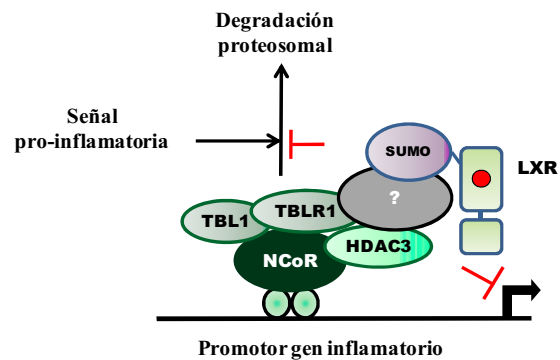


Figura 6.- Mecanismo de transrepresión de LXR sobre genes proinflamatorios. La inducción por parte de una señal proinflamatoria de algunos genes requiere un paso inicial de liberación del complejo corepresor que reprime la expresión del gen en ausencia de estímulo activador. La activación de LXR promueve su SUMOilación. En el promotor de determinados genes inflamatorios LXR SUMOilado evita la salida del complejo corepresor, reprimiendo así la inducción por la señal proinflamatoria. La molécula a través de la cual LXR interacciona con el complejo corepresor parece diferir según el tipo celular (GPS2 en el hígado y CORO2A en los macrófagos).

En ausencia de estímulo activador, algunos genes inflamatorios están reprimidos de forma activa por complejos corepresores que actúan en sus promotores y que implican la acción de NCoR y SMRT (Lee et al., 2000; Ogawa et al., 2004). La inducción de la transcripción de estos genes en respuesta a señales proinflamatorias requiere de un paso inicial de desrepresión que implica la liberación del complejo corepresor (Hoberg et al., 2004). Precisamente, la interferencia sobre la liberación de proteínas corepresoras del promotor de genes inflamatorios ha sido descrita como el mecanismo mediante el cual LXR y algunos otros receptores nucleares inhiben la expresión de genes inducidos por LPS en macrófagos (Ghisletti et al., 2007) (Figura 6). La mayor parte de los efectos represores de LXR sobre genes inducidos por LPS requieren de la expresión funcional de NCoR. Para un subgrupo de estos

genes, SMRT también es necesario para establecer un complejo corepresor estable (Ghisletti et al., 2007, 2009). En el hígado, la inhibición de la respuesta de fase aguda (APR, *acute phase response*) mediada por LXR también se basa en el bloqueo de la eliminación del complejo corepresor de los promotores de los genes inflamatorios (Venteclef et al., 2010). Pese a estas premisas, la disminución de la expresión de NCoR en astrocitos no parece afectar a la transrepresión mediada por LXR de los genes inducidos por IFN- γ (Lee et al., 2009), lo cual sugiere que o bien SMRT suple la ausencia de NCoR o un mecanismo diferente independiente de estos complejos corepresores media los efectos represores de los agonistas de LXR en este sistema.

Estudios sobre el mecanismo de transrepresión de los receptores nucleares han llevado a descubrir la asociación física de los LXR con miembros de la familia SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) (Poukka et al., 2000; Tian et al., 2002; Ghisletti et al., 2007). La sumoilación es una modificación post-traducciona reversible que consiste en la conjugación de SUMO a un sustrato. En mamíferos, existen tres miembros de la familia SUMO, llamados SUMO-1, -2 y -3, que pueden ser conjugados a las proteínas diana. La sumoilación requiere primero de la activación de un SUMO mediante una enzima heterodimérica de activación de SUMO-1 (enzima E1), que corta un péptido C-terminal de SUMO de manera ATP-dependiente. A continuación, el SUMO activado se transfiere temporalmente a una enzima de conjugación (enzima E2), generalmente UBC9 (*ubiquitin carrier protein 9*), que seguidamente media la conjugación del SUMO a la proteína diana en cooperación con SUMO E3 ligasas (revisado en Treuter & Venteclef, 2011). Las SUMO E3 ligasas más características son los miembros de la familia de proteínas inhibidoras de STAT activado (PIAS) (Palvimo, 2007), aunque otras proteínas incluyendo las histona deacetilasas (HDAC)2 y HDAC4/5 pueden también actuar como E3 ligasas (revisado en Treuter & Venteclef, 2011).

En macrófagos murinos, los LXRs activados por GW3965 son sumoilados, lo cual previene la liberación de los complejos corepresores del promotor de los genes inflamatorios (Ghisletti et al., 2007). Las proteínas implicadas en la sumoilación de LXR parecen depender del tipo celular y quizás del ambiente inflamatorio. En macrófagos estimulados con LPS, la activación de LXR β por GW3965 conduce a la sumoilación por SUMO2/3 en un proceso en el que HDAC4 actúa como E3 ligasa (Ghisletti et al., 2007). Estudios más recientes

en astrocitos estimulados con IFN- γ propone diferentes mecanismos de sumoilación para LXR α y LXR β en respuesta a ligandos de LXR: LXR α es sumoilado por SUMO-2/-3 utilizando HDAC4 como E3 ligasa y LXR β es sumoilado por SUMO-1, con PIAS1 actuando como E3 ligasa. Los LXRs sumoilados forman un complejo con STAT1 en astrocitos resultando en una inhibición del reclutamiento de STAT1 en el promotor de IRF1, sin afectar a la fosforilación de STAT1 o a su translocación al núcleo (Lee et al., 2009). Un estudio independiente, sin embargo, observó una reducción de los niveles de fosforilación en serina y tirosina de STAT1 inducidos por IFN- γ en la línea de monocitos THP-1 humanos en respuesta a 22-(R)-hidroxicolesterol (Li et al., 2011).

Se ha observado recientemente que dos proteínas previamente identificadas dentro de los complejos co-represores interactúan directamente con los LXRs sumoilados. En el hígado, la transrepresión sobre la APR por GW3965 está mediada de forma selectiva por LXR β . En presencia de GW3965, LXR β es sumoilado por SUMO-2/-3 y reclutado a un complejo corepresor en los promotores de los genes de la proteína C-reactiva y de la haptoglobulina mediante la interacción con el supresor de la vía de proteína G (GPS)2 (Venteclef et al., 2010). GPS2 es capaz de unirse a ambos LXRs (α y β), probablemente mediante una región de la molécula de LXR distinta al motivo de interacción con moléculas coactivadoras (Jakobsson et al., 2009).

En macrófagos, la transrepresión mediada por LXR implica la interacción de los LXRs sumoilados con la proteína CORONIN 2A (CORO2A) en vez de GPS2. CORO2A es una proteína de unión a la actina que contiene un motivo de interacción con SUMO-2/-3 conservado y está expresada principalmente en el núcleo de los macrófagos primarios (Huang et al., 2011). CORO2A se localiza en diversos promotores dependientes de NCoR en macrófagos residentes y participa en la salida de NCoR del promotor de Nos2 inducida por TLR mediante la interacción con actina nuclear oligomérica, aunque el papel exacto de la actina en este proceso permanece sin determinar. El modelo propuesto por Huang et al. (2011) sugiere que CORO2A se une a LXR sumoilado a través de un motivo de interacción con SUMO (SIM) bloqueando el reclutamiento de actina y la liberación de NCoR del promotor de Nos2.

LXR en la regulación positiva de genes con papel específico en la respuesta Inmune

Basándonos en las acciones antiinflamatorias de los agonistas de LXR, podríamos esperar que la activación de LXR afectara a la capacidad de las células del sistema inmunitario a la hora de establecer una respuesta agresiva contra patógenos. De hecho, la deficiencia en LXR confiere una mayor resistencia en modelos de infección con *Leishmania chagasi/infantum* (Bruhn et al., 2010). Sin embargo, en otros modelos de infección como *Mycobacterium tuberculosis* la deficiencia en LXR implica una mayor susceptibilidad a la infección (Korf and Beken, 2009). Estas observaciones sugieren que la vía de LXR ejerce acciones reguladoras complejas sobre la respuesta inmunológica que se extienden más allá de la transrepresión de la respuesta proinflamatoria y puede dar lugar a diferentes resultados dependiendo del patógeno invasor.

Hace varios años, se observó que la activación de LXR aumenta la supervivencia de los macrófagos durante infecciones causadas por diferentes bacterias, incluyendo *Listeria monocytogenes* (Joseph et al., 2004), *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, y en respuesta a diversas formas de estrés celular como la privación de factores de crecimiento (Valledor et al., 2004). Estos efectos correlacionan con una disminución de la expresión de varios miembros de la familia de las caspasas y otros factores proapoptóticos (Valledor et al., 2004) y con la inducción de un inhibidor de la apoptosis secretado por macrófagos (AIM) (Joseph et al., 2004; Valledor et al., 2004), que se observó que era diana específica de LXR α (Joseph et al., 2004) y de los genes antiapoptóticos Bcl2l1 y NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*). La inducción de AIM también juega un papel en la prevención de la apoptosis de los macrófagos en lesiones ateroscleróticas (Arai et al., 2005), aunque el mecanismo mediante el cual AIM promueve la supervivencia de los macrófagos todavía no se conoce.

Se ha observado que AIM secretado por los macrófagos es endocitado por los adipocitos, en los cuales AIM inhibe la actividad de la sintasa de ácidos grasos citosólica y aumenta la lipólisis (Kurokawa et al., 2010). El aumento de los ácidos palmítico y esteárico estimula la producción de quimioquinas vía la activación de TLR4, promoviendo la infiltración de macrófagos en el tejido (Kurokawa and Nagano, 2011). Las acciones proinflamatorias de AIM en el

tejido adiposo contrastan con el papel general de LXR como regulador negativo de la inflamación aunque sería interesante estudiar unas condiciones en las que AIM actuara de forma simultánea a la actividad transrepresora de LXR.

Estudios recientes han resaltado el papel de LXR en la regulación positiva de la fagocitosis de células apoptóticas. Hace años, se observó que la expresión de ABCA1 favorece la formación de fagosomas mediante la modificación de la composición de fosfolípidos de la membrana (Hamon et al., 2000). Recientemente, se ha identificado MERTK (*c-mer tyrosine kinase*) como una diana directa de LXR (A-Gonzalez et al., 2009). MERTK es un miembro de la familia de receptores tirosina quinasa MER/AXL/TYRO3 que actúa como receptor de Gas6, una proteína que se une a la membrana de células apoptóticas (Scott et al., 2001), favoreciendo así la fagocitosis y la eliminación de estas células. Se ha observado que la fagocitosis de células apoptóticas resulta en una activación de LXR (A-Gonzalez et al., 2009), con lo cual las células apoptóticas estarían promoviendo su propia eliminación (mediante la inducción de ABCA1 y MERTK). Curiosamente, se requiere de la expresión funcional de LXR para inhibir la expresión de varios mediadores inflamatorios y para la inducción transcripcional de las citoquinas deactivadoras TGF β e IL-10 en macrófagos que han fagocitado células apoptóticas. Estas observaciones sugieren que LXR tiene un papel importante también en la deactivación de los macrófagos en respuesta a la fagocitosis de células apoptóticas (A-Gonzalez et al., 2009).

LXR en el Sistema Nervioso Central

Se ha observado que LXR tiene un papel muy importante en la homeostasis del sistema nervioso central. Ratones deficientes en LXR β muestran deficiencias motoras en la edad adulta (Andersson et al., 2005). Además, estudios con modelos de diversos desórdenes del sistema nervioso, incluyendo modelos de Alzheimer (Zelcer and Khanlou, 2007), Parkinson (Dai et al., 2012), isquemia cerebral (Morales et al., 2008b) o esclerosis lateral amiotrófica (Bigini and Steffensen, 2010), muestran una mayor severidad de la enfermedad en ausencia de LXR.

En otros desórdenes nerviosos como la enfermedad de Niemann-Pick se ha observado que el tratamiento con agonistas de LXR disminuye la neurodegeneración y aumenta el tiempo de vida. Estos efectos de LXR sobre la enfermedad de Niemann-Pick son resultado, por un lado, del aumento del transporte reverso de colesterol del cerebro debido a la inducción de la expresión de los transportadores ABCA1 y ABCG1 y, por otro lado, de la disminución de la expresión de genes proinflamatorios (Repa et al., 2007). En modelos de Alzheimer el tratamiento con agonistas de LXR disminuye los niveles de péptidos β -amiloides (Lefterov et al., 2007). En ensayos *in vitro* se ha observado que la activación de LXR promueve la fagocitosis por parte de la microglía activada por fibras β -amiloides (Zelcer and Khanlou, 2007) y que la presencia de ApoE implica una mayor eficiencia de la degradación de estas fibras β -amiloides (Jiang et al., 2008).

Además el tratamiento con agonistas de LXR aumenta la supervivencia neuronal y tiene un efecto neuroprotector que se relaciona con una disminución de la inflamación en varios desórdenes nerviosos como la encefalomiелitis experimental autoinmune (Hindinger et al., 2006), diferentes tipos de isquemias (Morales et al., 2008b; Sironi et al., 2008; Cheng et al., 2010) y en las enfermedades de Parkinson (Dai et al., 2012) y Alzheimer (Lefterov et al., 2007; Cui et al., 2012).

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos.

El IFN- γ murino recombinante fue suministrado por Pierce Biotechnology (Rockford, IL). La proteína murina recombinante de M-CSF (rM-CSF) fue adquirida a R&D Systems (Minneapolis, MN). Como ligandos de LXR se utilizaron los agonistas sintéticos TO901317 suministrado por Cayman Europa (Tallinn, Estonia) y GW3965 suministrado por Tocris (Bristol, UK y el ligando endógeno 24,25-epoxicolesterol procedente de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) La Interleuquina-3 murina recombinante fue obtenida de Peprotech (Rocky Hill, NJ). El probucol, la Concanavalina A, el LPS, la estaurosporina y el ácido glutámico fueron adquiridos a Sigma-Aldrich.

Animales.

Los ratones C57BL/6 de entre 6 y 10 semanas de edad fueron adquiridos en Harlan. Los ratones deficientes para LXR (Repa, 2000b; Peet et al., 1998), fueron amablemente cedidos por el Dr. David Mangelsdorf (UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX). Los ratones deficientes en p27KIP1, originalmente generados por el Dr. Jim Roberts (Fero et al., 1996), fueron amablemente proporcionados por el Dr. Manuel Serrano (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, España). Los ratones deficientes para ABCG1 fueron adquiridos a Deltagen (San Carlos, CA) (Out et al., 2008). Los ratones deficientes para ABCA1 y para ApoE, inicialmente obtenidos a través de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), fueron amablemente cedidos por el Dr. Joan Carles Escolà-Gil (Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España). Los ratones deficientes en Stat1 fueron amablemente proporcionados por la Dra. Anna Planas (IDIBAPS, Barcelona, España).

Todos los protocolos que requieren manipulación animal fueron aprobados por el comité ético de experimentación con animales del Parc Científic de Barcelona y la Universitat de Barcelona.

Cultivos celulares.

Macrófagos derivados de médula ósea se obtuvieron de ratones C57BL/6 de entre 6 y 10 semanas de edad (Harlan, Indianapolis, IN) a partir de la médula ósea extraída de los fémures, húmeros y tibias del ratón. Los precursores de la médula ósea fueron cultivados en DMEM (PAA Laboratories, United Kingdom), suplementado con 20% de suero fetal de ternero (FCS) (PAA Laboratories) inactivado por calor y 30% de medio condicionado L-cell (L-cell cm) como fuente del factor de diferenciación de macrófagos M-CSF.

Las células de microglía primaria fueron obtenidas a partir de la corteza cerebral de ratones neonatos procesada según el protocolo descrito (Saura et al., 2003) con algunas modificaciones. Los tejidos corticales fueron homogeneizados e incubados en placas de cultivo celular en presencia de DMEM suplementado con 10% de FCS inactivado por calor. Los cultivos mixtos de glia confluentes fueron sometidos a una segregación mecánica y las células de microglía fueron seleccionadas por adherencia a flascos de plástico durante 3 horas. Estas poblaciones de microglía tenían una pureza >95% como se determinó mediante el análisis por citometría de flujo con un anticuerpo anti-F4/80 (eBioscience, San Diego, CA) conjugado a FITC.

Las neuronas corticales fueron obtenidas a partir de la corteza cerebral de embriones de 16 días. Los tejidos corticales fueron homogeneizados e incubados en placas de cultivo celular previamente recubiertas de poli-D.lisina (Sigma-Aldrich) en presencia de medio Neurobasal (GIBCO) suplementado con 0,5mM de glutamina, 0,5mM de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{CO}_3$, 45% de glucosa y el suplemento B27 (1x). El segundo día de cultivo se añadieron los antimetabólicos 5-Fluoro-2'-deoxiuridina (2mg/ml) y Uridina (25mg/ml) que se retiraron 2 días después. El medio fue renovado cada 2-3 días y los experimentos se llevaron tras 7 días.

La línea celular de macrófagos RAW264.7 fue cultivada en DMEM suplementado con 10% de FCS inactivado por calor.

El L-cell cm fue obtenido a partir de células L929 cultivadas en DMEM suplementado con 10% de FCS inactivado por calor. En algunos experimentos, se utilizó L-cell como fuente de M-CSF. El medio con alto contenido en GM-CSF (GM-CSF containing medium) fue obtenido a partir de la línea celular de fibroblastos J558L cultivada en DMEM suplementado con 10% de FCS inactivado por calor.

AIM recombinante (rAIM) fue expresado en células embrionarias humanas de riñón (HEK-293 EBNA), tal y como se había llevado a cabo previamente con AIM/SP α (Sarrias et al., 2004). Brevemente, el ADNc de Aim murino se obtuvo por transcripción reversa de ARN total de bazo de ratón y una posterior amplificación por PCR con los primers específicos 3'-GCCCGGCTAGCGGAGTCTCCAACCAAAGTG-5' y 3'-CGCGCGGATCCTCACACATCAAAGTCTG-5', los cuales incorporan lugares de restricción para NheI y BamHI, respectivamente. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCEP.Pu, cedido por los Dres. T. Sasaki y R. Timpl (Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried, Alemania) y transfectados en las células HEK-293-EBNA. Las células transfectadas con Aim fueron seleccionadas con G418 (250 μ g/ml) y puromicina (1 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) en medio DMEM suplementado con 10%FCS. La expresión de rAIM se confirmó mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Las células transfectadas expresando AIM o células control no transfectadas se mantuvieron en crecimiento hasta la confluencia y se reemplazó el medio por DMEM sin FCS. El medio se recogió dos veces cada 72h.

Ensayos de proliferación.

La proliferación celular fue determinada mediante ensayos de incorporación de timidina previamente descritos (Celada et al., 1996), con pequeñas modificaciones. Macrófagos quiescentes fueron estimulados con rM-CSF durante 24 horas. La timidina-H³ (1 μ Ci/ml; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) fue añadida 6 horas antes de la finalización del experimento. Las células fueron fijadas en 70% metanol, lavadas con 10%TCA y lisadas en 1%SDS/0,3M NaOH. La radioactividad fue cuantificada en líquido de centelleo utilizando un contador 1400 Tri-Carb Packard (GMI, Minneapolis, MN). Cada punto fue llevado a cabo por triplicado y los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar. Para evaluar la proliferación de la microglía, las células fueron incubadas con DMEM-10%FCS y L-cell cm. La incorporación de timidina fue determinada como se ha descrito previamente.

De forma alternativa, los macrófagos fueron incubados con L-cell cm y agonistas de LXR durante diferentes periodos de tiempo (hasta 96 horas). El

número de células viables fue determinado mediante el uso de *trypan blue* y un hemocitómetro. Cada punto fue llevado a cabo por triplicado y los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar.

Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo.

Las células (10^6) fueron fijadas en 70% etanol, lavadas en PBS e incubadas en PBS suplementado con 0'05% Tritón X-100, 5 μ g/ml de yoduro de propidio y 0,5 μ g/ml de RNasa A (Sigma-Aldrich) durante 1 hora. La tinción con yoduro de propidio fue determinada mediante el citómetro de flujo Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter, Fullerton, CA). 12.000 núcleos por cada histograma y distribución de ciclo celular, así como el porcentaje de células en subG0/G1 fueron analizados mediante el programa multicycle (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

Determinación de la respuesta proliferativa de los macrófagos *in vivo*.

Se utilizó un modelo *in vivo* de peritonitis que fue inducido mediante una inyección intraperitoneal (i.p.) de Concanavalina A (Sigma-Aldrich) (40 μ g/animal en 1ml de PBS) en ratones (C57BL/6) de entre 6 y 8 semanas de edad. Tres días después, se indujo la proliferación *in vivo* de los macrófagos mediante una inyección i.p. de L-cell cm al 5% en 2ml de DMEM. La activación de LXR fue inducida mediante la inyección i.p. de T1317 (10mg/kg) 18 horas antes y simultáneamente a la inyección del estímulo proliferativo. Los animales control, tanto positivo como negativo, recibieron 2 inyecciones de vehículo (DMSO en DMEM). Las células fueron obtenidas mediante un lavado peritoneal 24 horas después de la última inyección i.p.. Las células fueron fijadas en 70% etanol (en PBS) y sometidas a una tinción con yoduro de propidio como se ha descrito anteriormente. Se utilizó un anticuerpo contra el marcador de superficie de macrófagos F4/80 conjugado a FITC para determinar cuál de las poblaciones detectadas en el análisis de dispersión frontal (*forward scatter*)/dispersión lateral (*side scatter*) correspondía a los macrófagos. Para cada muestra, la población de macrófagos fue seleccionada y la distribución del ciclo celular fue determinada como se ha descrito anteriormente. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el test de Wilcoxon/Mann-Whitney.

Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de PCR a tiempo real.

Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío antes de extraer el ARN total utilizando TriReagent (Sigma-Aldrich) según las recomendaciones del fabricante. Para la síntesis del ADNc, 1µg de ARN fue sometido a retrotranscripción utilizando la transcriptasa reversa M-MLV RNase H Minus Point Mutant oligo (dT)₁₅ y una mezcla de nucleótidos para PCR (Promega, Madison, WI). La PCR a tiempo real (rt-PCR) fue llevada a cabo utilizando Power SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La secuencia de todos los primers utilizados en estos estudios se muestran en la tabla 1. El anillamiento fue llevado a cabo a 60°C durante 30 segundos para todos los primers. La monitorización a tiempo real de la amplificación por PCR se llevó a cabo mediante el ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los datos fueron expresados como niveles relativos de ARNm normalizados con la expresión de la proteína ribosomal L14 o el ARNr 18S en cada una de las muestras. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student de dos colas.

Extracción de proteína y análisis de Western blot.

Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y lisadas en hielo con la solución de lisis (1% Tritón X-100, 10% glicerol, 50mM HEPES pH 7.5, 250mM NaCl, 1µg/ml aproptinina, 1µg/ml leupeptina, 1µg/ml iodacetamida, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sodio). El material insoluble fue eliminado mediante centrifugación a 13000g durante 8 minutos a 4°C. Los lisados celulares (50-100µg) fueron hervidos a 95°C en tampón de carga Laemmli y separado por SDS-PAGE y transferido electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL; GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Germany). Las membranas fueron bloqueadas en TBS-0'1% Tween 20 (TBS-T) con 5% leche durante 16-18 horas a 4°C y entonces incubadas con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente. Para estudiar la fosforilación de ERK-1/2, se utilizaron anticuerpos contra ERK-1/2 difosforilado (clon MAPK-YT; Sigma-Aldrich) y contra ERK-2 total (Santa Cruz, CA). La expresión proteica de ciclinas fue determinada con un kit anti-ciclina

(Rockland, Gilbertsville, PA). Anticuerpos contra CDK2 y CDK4 fueron adquiridos a Santa Cruz Biotechnologies. Para estudiar la fosforilación de Stat1 se utilizaron anticuerpos contra Stat1 fosforilado en Serina-727 (Cell Signaling, Beverly, MA) y contra Stat1 fosforilado en Tirosina-701 (Invitrogen, San Diego, CA). La expresión de Stat1 total fue determinada utilizando un anticuerpo contra Stat1 p84/p91 (Santa Cruz Biotechnologies). Los anticuerpos para analizar la expresión de ABCA1 fueron adquiridos a NOvus Biologicals (Littleton, CO) y los anticuerpos anti-NOS2 y anti-RXR α fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Para comprobar la carga y transferencia de la proteína, se utilizaron anticuerpos contra β -actina (Sigma-Aldrich) o contra α -tubulina (Invitrogen). En general, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T y entonces incubadas durante 1 hora con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa: anti-IgG de ratón (Sigma-Aldrich) y anti-IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch; Pennsylvania, PA). Después de 3 lavados de 15 minutos con TBS-T, se llevó a cabo la detección de quimioluminiscencia y las membranas fueron expuestas a películas de rayos X (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Ensayo de actividad JNK.

La actividad JNK fue determinada según se describió (Díaz-Delfín et al., 2007). Brevemente, las células fueron lisadas con el tampón de lisis (20mM HEPES.Na pH 7.5, 10mM EGTA, 40mM β -glicerofosfatasa, 2,5mM MgCl₂, 1% NP-40, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml iodacetamida, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sodio, 1mM DTT) e inmunoprecipitadas con proteína sefarosa A y anticuerpo contra JNK1. Después de varios lavados, la reacción fue llevada a cabo con 1 μ g de GST-C-JUN (1-169; MBL International, Woburn, MA) como sustrato de JNK, 20 μ M ATP y 1 μ Ci ATP- γ [P³²]. Las muestras fueron sometidas a una electroforesis de SDS-PAGE y el gel se secó y se expuso a una película de rayos X.

Silenciamiento génico mediante siRNA.

Utilizamos la tecnología siRNA (ARN de interferencia pequeños o small *interfering RNA*) para bloquear la inducción de los transportadores de colesterol Abcg1 y Abca1 (On Target Plus Smart Pool; Dharmacon; Lafayette, CO) o del factor de transcripción Srebp1c (siMax siRNA NM_011480si.1; Eurofins MWG Operon). El siRNA control fue diseñado contra la luciferasa (5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3') adquirido a Dharmacon. Los siRNAs fueron transfectados a los macrófagos por electroporación como estaba descrito (Valledor et al., 2008). Brevemente, los macrófagos (4×10^6 células en 400 μ l de DMEM) fueron mezclados con siRNA (1'5 μ M) en cubetas de 4mm de poro (BTX no. 640; Genotronics) y colocadas en hielo durante 15 minutos. La electroporación fue llevada a cabo a 2300 μ F, 300V, 13 Ω (~27ms) con un electroporador ECM 600 (BTX). Las muestras fueron colocadas en hielo durante 20 minutos antes de la reconstitución en DMEM con 20%FCS y 30%L-cell cm. Los subsiguientes ensayos fueron realizados 24 horas después de la transfección. La efectividad de los siRNAs utilizados en este estudio fue comprobada mediante PCR a tiempo real. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student de dos colas.

Análisis masivo de expresión génica.

El ARN total fue extraído utilizando Trizol (Invitrogen). Las dianas de hibridación fueron preparadas a partir de 25ng de ARN total utilizando el sistema de amplificación isothermal SPIA Biotin System v2 (NuGEN Technologies, Inc., San Carlos, CA). 2,2 μ g de ADNc fueron hibridados en cada Mouse 430 2.0 GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA). Los GeneChips fueron escaneados en un escáner GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). Se generaron archivos CEL a partir de archivos DAT utilizando GCOS software (Affymetrix). Las estimaciones de expresión fueron calculadas a partir de las intensidades de las sondas utilizando el algoritmo WPP (Auer et al., 2007). Las estimaciones de expresión generadas mediante WPP representan valores de log₂. Para cada tratamiento, los valores de expresión de los diferentes tratamientos se muestran en relación a la expresión en las células control (en escala log₂), substrayendo los valores de expresión de estas células a los obtenidos en cada

tratamiento. El promedio de los valores de expresión de dos experimentos independientes fue utilizado para los siguientes análisis. El mapa cromático fue generado a través de CIMminer, programa desarrollado por Genomics and Bioinformatics Group, Laboratory of Molecular Pharmacology (LMP), Center for Cancer Research, National Cancer Institute.

Análisis funcional basado en la anotación de Gene Ontology.

Las listas de genes obtenidas del análisis de microarray fueron asociadas a anotaciones de procesos biológicos según la anotación definida por el Consorcio Gene Ontology (GO) (Gene and Consortium, 2001). Se utilizó el recurso bioinformático DAVID (Huang et al., 2009a; b) para buscar enriquecimientos estadísticamente significativos de categorías funcionales.

Transfecciones transitorias.

Células RAW264.7 fueron cotransfectadas con 0,5 μ g de un plásmido con el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de *Nos2*, 10 ng de un plásmido de expresión de renilla y 0,5 μ g de pcDNA3 expresando LXR α murino o LXR β murino. Las células control fueron transfectadas con los plásmidos de luciferasa y renilla y 0,5 μ g de pcDNA3 vacío. En otra serie de experimentos, las células RAW264.7 fueron cotransfectadas con 0,5 μ g de un plásmido con el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor murino de *Abca1* (Chawla et al., 2001), 10ng de un plásmido de expresión de β -galactosidasa bajo el control del promotor de β -actina y 0,5 μ g de pcDNA3 expresando LXR β y RXR α murinos. Las células control fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de luciferasa y β -galactosidasa y 1 μ g de vector pcDNA3 vacío. Todas las células fueron transfectadas utilizando el reactivo para transfección Superfect (Qiagen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras la transfección, las células fueron incubadas con medio en presencia de agonistas de LXR y/o IFN- γ . Se analizó la actividad luciferasa y renilla de las células utilizando el sistema de Promega Dual Luciferase reporter Assay (Promega) en un luminómetro TD-20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA). La actividad β -galactosidasa se midió utilizando un kit comercial de Applied Biosystems y un luminómetro Infinite M200 (Tecan, Männedorf,

Suiza). Los niveles de actividad luciferasa fueron normalizados respecto a los de la actividad renilla o β -galactosidasa. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student de dos colas.

Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina.

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se llevaron a cabo según se había descrito previamente (Wagner et al., 2003). Brevemente, 20×10^6 macrófagos fueron fijados con formaldehído al 1% tras llevar a cabo los estímulos correspondientes. Los complejos fijados fueron resuspendidos y sonicados, dando lugar a fragmentos de ADN de entre 200 y 1200bp. La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando 1 μ g de anticuerpo de conejo anti-STAT1 p84/p91 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), 1,5 μ g de anticuerpos de conejo anti-LXR (generados como se describe en Jakobsson et al., 2009) o 1,5 μ g de anticuerpo de conejo anti-RXR α (Santa Cruz Biotechnology). IgGs de conejo (Sigma-Aldrich) fueron utilizadas como control de uniones inespecíficas. La unión del ADN inmunoprecipitado a la proteína fue revertida a 65°C durante 18 horas y, entonces, purificado utilizando un kit de purificación de PCR (Qiagen). 1 μ l de un volumen de ADN extraído de 30 μ l fue utilizado para el análisis de rt-PCR o PCR a tiempo final. Las muestras de *Input* fueron diluidas 1:2 antes de llevar a cabo el análisis de PCR. Los primers mostrados en la tabla 2 fueron utilizados para amplificar las regiones genómica amplificadas en este trabajo. Para *Nos2* y *Cxcl11* se diseñaron primers cercanos a elementos de respuesta GAS en la región promotora de estos genes. Para *Abca1*, los primers se diseñaron alrededor del LXRE en posición -65 en el promotor de *Abca1* (Costet et al., 2000). Para *Srebp1c*, los primers se sitúan alrededor de dos LXREs localizados en las posiciones -249 y -200 en el promotor de *Srebp1c* (Yoshikawa et al., 2001). En el caso de *Abcg1*, los primers fueron diseñados para reconocer un enhancer intrónico con un LXRE localizado a +16098 del inicio de transcripción de *Abcg1* (Nakamura et al., 2004). La unión de al menos LXR β ha sido demostrada mediante ChIP-sequencing (datos depositados en <http://genome.ucsc.edu> por C. K. Glass, University of California San Diego). La PCR a tiempo final fue llevada a cabo utilizando el kit de PCR REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich).

El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student de dos colas.

Ensayo de eflujo de colesterol.

Macrófagos derivados de médula ósea fueron cargados durante 24 horas con 50µg/mL de LDLs acetiladas (acLDL) con colesterol marcado con marcado con H³ (4µCi/ml) en DMEM suplementado con 5% de FCS inactivado por calor y 100µg/ml de penicilina/estreptomicina en presencia o ausencia de IFN-γ (5ng/ml). El medio de carga fue retirado y las células fueron equilibradas en DMEM-0,2% BSA libre de lípidos (Sigma-Aldrich) durante 2 horas. Después de esto, el medio fue retirado y las células fueron mantenidas durante 24 horas en DMEM con o sin IFN-γ y/o T1317 (1µM). El eflujo celular de colesterol fue inducido añadiendo 20µg/ml de ApoAI libre de lípidos (Sigma-Aldrich) durante las últimas 4 horas del ensayo. Al final del periodo de eflujo, el medio fue recogido y las células fueron lisadas en NaOH 0,5N. El contaje de radioactividad fue determinado en ambas fracciones, el medio y el lisado celular, utilizando un contador de centelleo 1500 Tri-Carb Packard. El porcentaje de eflujo de colesterol fue calculado como $100 \times (\text{cpm medio}) / (\text{cpm medio} + \text{cpm fracción celular})$. Cada punto fue llevado a cabo en triplicado y los resultados fueron expresados como promedio ± desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student de dos colas.

Modelo *in vivo* de neuroinflamación.

La neuroinflamación inducida por IFN-γ se llevó cabo basándonos en (Kong et al., 2000) con algunas modificaciones. Ratones de 10 semanas de edad fueron sometidos a una inyección de IFN-γ (20ng en 10µl) en PBS) en la región ventricular (tercer ventrículo) del cerebro en las siguientes coordenadas relativas a bregma: AP, -0.3mm; L, 0.0mm and 3.0mm bajo la superficie dural con la incisión a 3mm por encima de la línea interaural. Los controles fueron inyectados con vehículo (PBS). La activación de LXR fue inducida mediante la inyección intraperitoneal (i.p.) de T1317 (10mg/kg) a 2 días, 1 día y 4 horas antes de la inyección intraventricular de IFN-γ. Los controles fueron

inyectados i.p. con vehículo (DMSO en PBS). Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la inyección con IFN- γ o PBS y los cerebros fueron extraídos. El ARN total fue extraído de cada hemisferio (sin bulbo olfatorio) utilizando TriReagent (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el test U de Wilcoxon/Mann-Whitney.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
Abca1	5'-GCGAGGGCTCATCGACAT-3'	5'-GAAGCGGTTCTCCCAAAC-3'
18S	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
Abcg1	5'-TCACCCAGTTCTGCATCCTCTT-3'	5'-GCAGATGTGTCAGGACCGAGT-3'
Aim	5'-GTTGGATCGTGTTCCTCAGA-3'	5'-TCCCAGTACTGCACCTTGGT-3'
Apoc2	5'-ACCTGTACCAGAAGACATACCC-3'	5'-GTAAAAATGCCTGCGTAAGTGC-3'
ApoE	5'-CTGACAGGATGCCTAGCCG-3'	5'-CGCAGGTAATCCCAGAAGC-3'
Bcl2l1	5'-TCAGCACGAGCAGTCAGCC-3'	5'-TCTTCCAGGATCCAAAGCCA-3'
Ccl2	5'-AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3'	5'-GCTGCTGGTGATCCTCTTGT-3'
Ccl3	5'-TTCTCTGTACCATGACACTCTGC-3'	5'-CGTGGAACTTCCGGCTGTAG-3'
Ccl5	5'-CTGCTGCTTTGCCTACCTCT-3'	5'-TCCTTCGAGTGACAAACACG-3'
Ccnb1	5'-AAGGTGCCTGTGTGTGAACC-3'	5'-GTCAGCCCCATCATCTGCG-3'
Ccnd1	5'-GCGTACCCTGACACCAATCTC-3'	5'-CTCCTCTTCGCACTTCTGCTC-3'
CCR5	5'-GTGAGACATCCGTTCCCCCT-3'	5'-AATCCATCCTGCAAGAGCCA-3'
Cdk2	5'-AGTGGCTGCATCACAAGGA-3'	5'-CAAGCTCCGTCATCTTCAT-3'
Cdk4	5'-TGGAGCGTTGGCTGTATCTTT-3'	5'-TGGAGGCAATCCAATGAGATC-3'
Ch25h	5'-TGCTACAACGGTTCGGAGC-3'	5'-AGAAGCCCACGTAAGTGATGAT-3'
Cxcl10	5'-TCCCTGCGAGCCTATCCTG-3'	5'-TTTTCATCGTGGAATGATCTC-3'
Cxcl11	5'-AATTTACCCGAGTAACGGCTG-3'	5'-ATTATGAGGCGAGCTTGCTTG-3'
Idol	5'-ATGCTGTGCTATGTGACGAGG-3'	5'-TCGATGATCCCTAGACGCCTG-3'
ItgaL	5'-CCAGACTTTTGCTACTGGGAC-3'	5'-GCTTGTTCCGTCAGTGATAGAG-3'
L14	5'-TCCCAGGCTGTTAACGCGGT-3'	5'-GCGCTGGCTGAATGCTCTG-3'
LXR α	5'-CCTTCCTCAAGGACTTCAGTTACAA-3'	5'-CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT-3'
LXR β	5'-CATTGCGACTCCAGGACAAGA-3'	5'-CCCAGATCTCGGACAGCAAG-3'
Mertk	5'-GACTCCCTATCCCGGAGTTC-3'	5'-CTGCAGCCTCAACACAGAGA-3'
Naip	5'-GCCAAGTGGTTCCCAAAT-3'	5'-CCCGTTACATGAACAAAATCCCT-3'
NOS2	5'-GCCACCAACAATGGCAACA-3'	5'-CGTACCGGATGAGCTGTGAATT-3'
Pltp	5'-CGCAAAGGGCCACTTTTACTA-3'	5'-GCCCCATCATATAAGAACCAG-3'
Ptgs2	5'-ATTCTTTGCCAGCACTTCA-3'	5'-GGGATACACCTCTCCACCAA-3'
RXR α	5'-TAGTCGCAGACATGGACACC-3'	5'-GTTGGAGAGTTGAGGGACGA-3'
RXR β	5'-GCACAGAACTCAGCCATT-3'	5'-CATCCTCATGTCACGCATTT-3'
RXR γ	5'-TAGTCGCAGACATGGACACC-3'	5'-GTTGGAGAGTTGAGGGACGA-3'
Skp2	5'-AAACCTTTGTGGGTGCTCTG-3'	5'-TGGGTGATGGTGTGGTAA-3'
Srebp1c	5'-AGGCCATCGACTACATCCG-3'	5'-ATCCATAGACACATCTGTGCCTC-3'

Tabla 1.- Primers utilizados en el análisis de expresión génica.

Gen	Primer Forward	Primer Reverse
Abca1	5'-GCTTTCTGCTGAGTGACTGAACTAC-3'	5'-CAATTACTGCTTTTTGCCGCG-3'
Abcg1	5'-CCTCCTTCTGTGGTTCTGTGA-3'	5'-AGCGAGCATTGACCGATAGT-3'
β -actina	5'-ACTATTGGCAACGAGCGGTTC-3'	5'-AAGGAAGGCTGGAAAAGAGCC-3'
Cxcl11	5'-GAAAAGCCACCTGCTGAGCA-3'	5'-GGCAGTATCAGGAATTCCCT-3'
Nos2	5'-ATTGGCACCATCTAACCTCACT-3'	5'-ATGCAAGGCCATCTCTTCC-3'
Srebp1c	5'-GAACCAGCGGTGGGAACACAGAGC-3'	5'-GACGGCGGCAGCTCGGGTTTCTC-3'

Tabla 2.- Primers utilizados en el análisis de inmunoprecipitación de cromatina.

OBJETIVOS

Objetivos

1.- Estudio del papel de los Liver X Receptors en la proliferación de macrófagos y microglía.

2.- Estudio del papel de los Liver X Receptors en la activación por IFN- γ de macrófagos y microglía.

RESULTADOS

1 Estudio del papel de los Liver X Receptors en la proliferación de macrófagos y microglía.

1.1 Efecto de LXR sobre la proliferación de macrófagos y microglía

Con el objetivo de estudiar los efectos de LXR sobre la proliferación celular escogimos como modelo macrófagos derivados de médula ósea. La inducción de la proliferación de los macrófagos la llevamos a cabo mediante dos vías: M-CSF recombinante (rM-CSF) o medio condicionado L-cell (L-cell cm) como fuente de M-CSF. Como primera aproximación los macrófagos fueron incubados con los agonistas de LXR TO901317 (T1317; 1 μ M) y GW3965 (1 μ M) 8 horas antes del tratamiento con rM-CSF (20ng/ml) durante 24 horas. Se añadió timidina tritiada (timidina-H³) 6 horas antes de la finalización del experimento. La incorporación de timidina tritiada durante la síntesis de ADN se utilizó como indicador de proliferación. Los resultados muestran que el tratamiento con los agonistas de LXR inhibe de manera dependiente de dosis la incorporación de timidina en respuesta a M-CSF (Figura 7).

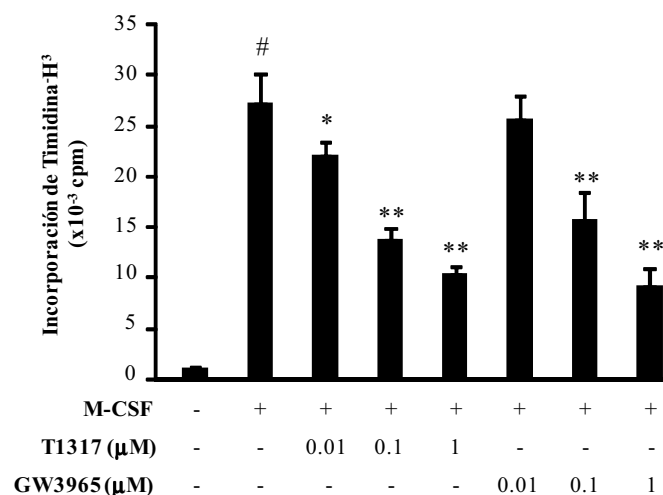


Figura 7.- Los agonistas de LXR inhiben la proliferación de los macrófagos de manera dependiente de dosis. Los macrófagos fueron privados de M-CSF 24h antes del tratamiento con los agonistas de LXR T1317 y GW3965 en las concentraciones indicadas durante 8h. Las células control fueron tratadas con DMSO. Tras las 8h los macrófagos fueron incubados con rM-CSF murino (20ng/ml) durante 24h. Se añadió timidina-H³ 6 horas antes de finalizar el experimento. Se utilizó la incorporación de timidina-H³ como indicador de proliferación. Se representan las medias de triplicados \pm SD. * p <0,05; ** p <0,01 respecto a las células tratadas con M-CSF, # p <0,01 respecto a las células control (mediante test T-Student). Resultados

similares se obtuvieron en tres experimentos independientes y se muestra uno como representativo.

Dado que LXR ejerce efectos inhibitorios sobre la proliferación en respuesta a M-CSF decidimos evaluar si la señalización por M-CSF regula la expresión de LXR o de su compañero heterodimérico RXR. Con este propósito, analizamos la expresión de LXR α , LXR β , RXR α , RXR β y RXR- γ durante el proceso de diferenciación de los macrófagos en respuesta a M-CSF. Observamos que la expresión de LXR α y β y RXR α y β aumenta a lo largo del proceso de diferenciación con M-CSF (Figura 8A). No se muestra la expresión de RXR γ ya que no se detectó en estas células.

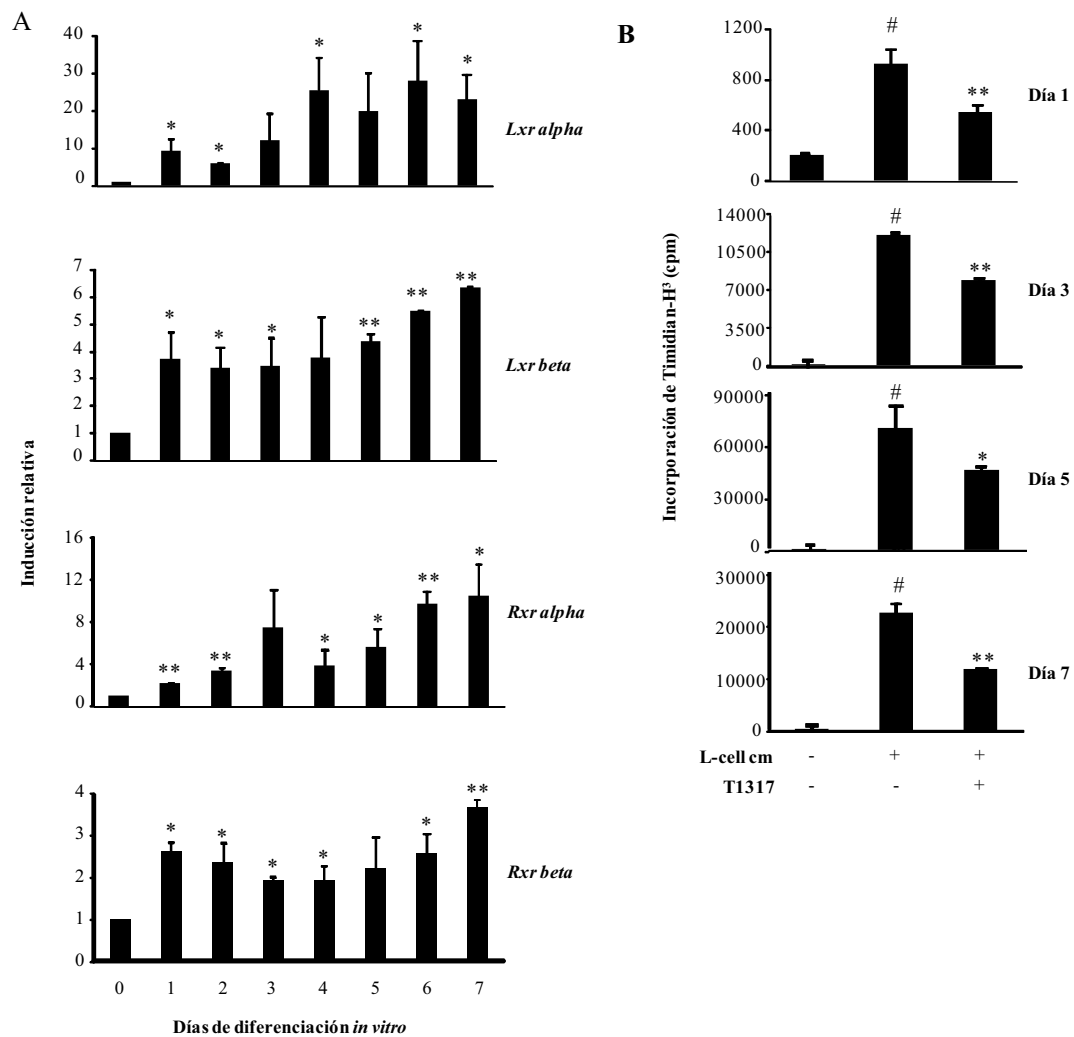


Figura 8.- Expresión de las isoformas de LXR y RXR durante la diferenciación de los macrófagos. A) Células de médula ósea fueron diferenciadas *in vitro* en medio diferenciador de macrófagos. La expresión de las isoformas de Lxr y Rxr en macrófagos en diferentes días de

diferenciación fue determinada mediante PCR a tiempo real. Los valores de expresión de los genes fueron normalizados con los niveles de expresión del RNA ribosomal 18S. Los niveles de inducción relativa fueron calculados tomando como referencia la expresión a día 0. Los gráficos muestran el promedio de los niveles \pm SEM de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,05$ respecto a las células a día 0 (mediante test T-Student). B) Células a diferentes días tras el comienzo de la diferenciación fueron privadas de M-CSF durante 18h en presencia de T1317 (1 μ M) o vehículo (DMSO) y entonces estimuladas con L-cell cm (15% v/v) durante 24h. Se añadió timidina-H³ 6 horas antes de finalizar el experimento. Se utilizó la incorporación de timidina-H³ como indicador de proliferación. Se representan las medias de triplicados \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a las células tratadas con M-CSF, # $p < 0,01$ respecto a las células control (mediante test T-Student). Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes y se muestra uno como representativo.

Teniendo en cuenta que la expresión de las isoformas de LXR y RXR aumenta durante la diferenciación quisimos comprobar los efectos antiproliferativos de LXR sobre estas células mieloides en diferentes estadios de diferenciación en respuesta a M-CSF. Con esta finalidad, células mieloides a diferentes días después de empezar la diferenciación fueron preincubadas con T1317 (1 μ M) durante 18 horas en ausencia de factores de crecimiento. Seguidamente fueron tratadas durante 24 horas con L-cell cm (15% v/v). Los resultados mostraron que T1317 tiene capacidad antiproliferativa sobre las células mieloides en todos los estadios analizados (Figura 8B).

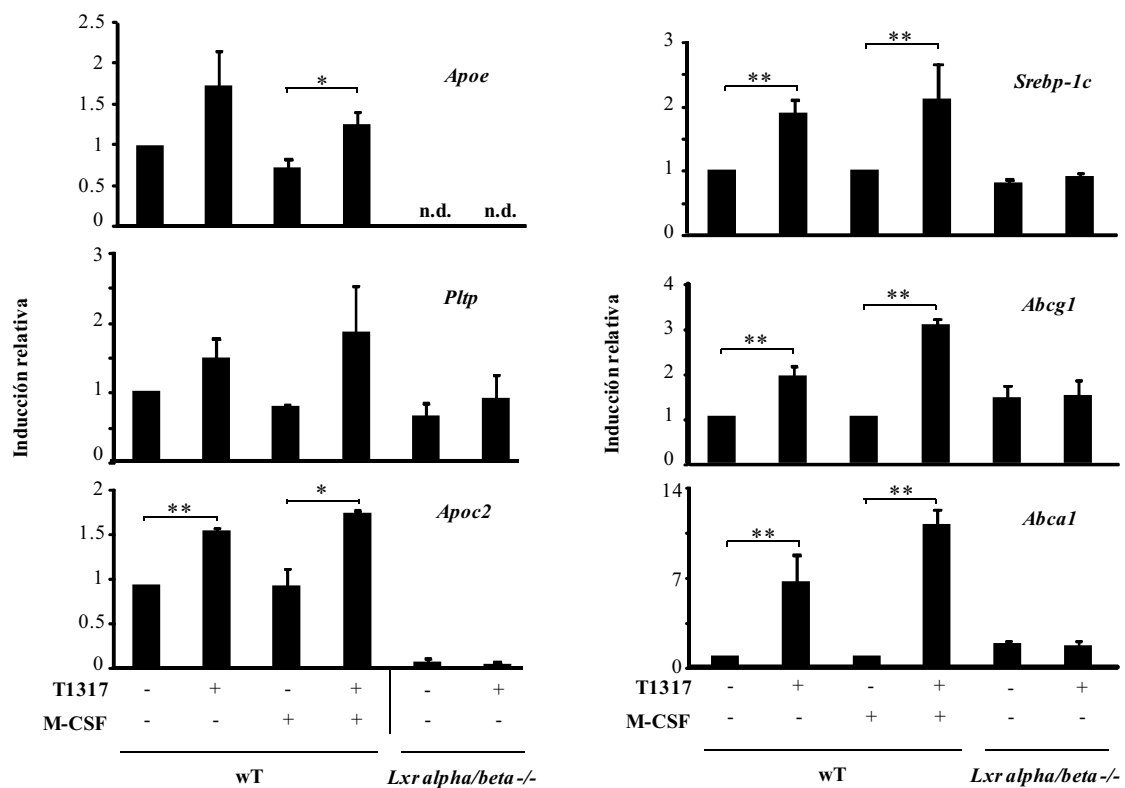
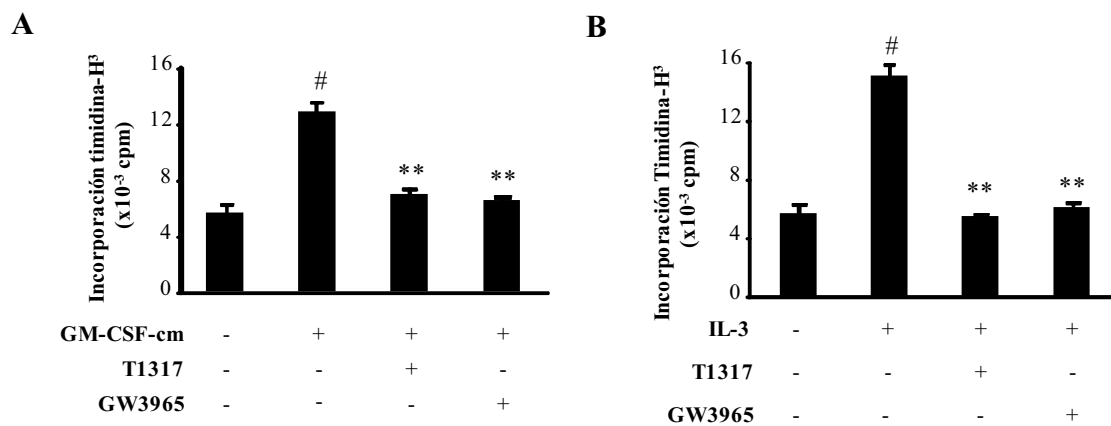


Figura 9.- La actividad de LXR no se muestra afectada por la presencia de M-CSF. Macrófagos *wildtype* (wT) ya diferenciados fueron incubados durante 24h en presencia o ausencia de rM-CSF (30ng/ml) y entonces estimulados con T1317 (1 μ M) o vehículo durante

18h. Como control negativo de la activación de LXR, macrófagos deficientes para LXR α/β fueron incubados con vehículo o T1317. La expresión de los genes diana de LXR fue evaluada mediante PCR a tiempo real y normalizada por los niveles de expresión de la proteína ribosomal *L14*. Los valores de inducción relativa fueron calculados utilizando como referencia los valores de expresión de las células wT control. Los gráficos muestran los promedios \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ respecto a las células wT control sin agonista (mediante test T-Student). n.d., niveles no detectables.

Los diferentes resultados mostraron que LXR ejerce efectos negativos sobre la respuesta a M-CSF pero quisimos conocer si estos efectos eran recíprocos. Para evaluar los posibles efectos de M-CSF sobre la actividad de LXR analizamos la inducción de los genes diana de LXR en presencia o ausencia de M-CSF. Con este fin, macrófagos ya diferenciados fueron tratados con rM-CSF (30ng/ml) durante 24 horas antes de estimular con T1317 o vehículo durante 18 horas. La activación de LXR induce la expresión de genes implicados en la homeostasis lipídica como *Abca1*, *Abcg1*, *Srebp-1c*, *Apoe* y *Apoc2* de forma LXR dependiente, ya que en macrófagos procedentes de ratones deficientes en LXR no se observa esta inducción. Observamos que la expresión basal de las dianas de LXR analizadas no se muestra inhibida por la presencia de M-CSF. Tampoco se observa inhibición sobre la inducción de estos genes en respuesta



a los ligandos de LXR (Figura 9).

Figura 10.- La activación de LXR inhibe la proliferación de los macrófagos en respuesta a IL-3 y GM-CSF. Células a día 5 de diferenciación fueron incubadas en medio sin M-CSF durante 18h en presencia de T1317 (1 μ M) o vehículo (DMSO) y entonces estimuladas con 5% de medio enriquecido en GM-CSF (A) o IL-3 (B) recombinante (5ng/ml) durante 24h. Se añadió timidina-H³ 6 horas antes de finalizar el experimento. Se utilizó la incorporación de timidina-H³ como indicador de proliferación. Se representan las medias de triplicados \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto a las células tratadas con M-CSF, # $p < 0,01$ respecto a las células control (mediante test T-Student). Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

Dado que los macrófagos pueden proliferar tanto en respuesta a M-CSF como en respuesta a IL-3 o GM-CSF quisimos estudiar los efectos de la activación de LXR sobre la proliferación en inducida por estos estímulos proliferativos. Para ello, células a día 5 de diferenciación fueron pretratadas con T1317, GW3965 o vehículo durante 18 horas antes del estímulo con las citoquinas GM-CSF (GM-CSF containing medium 5%) o IL-3 (5ng/ml). Los resultados de incorporación de timidina- H^3 mostraron que ambos agonistas de LXR tienen capacidad de inhibir la proliferación inducida por GM-CSF e IL-3 (Figura 10). Por lo tanto, los resultados sugieren que los efectos antiproliferativos de LXR afectan a varias vías de inducción de la proliferación en macrófagos.

Nuestro siguiente propósito fue confirmar la capacidad antiproliferativa de LXR sobre células de microglía. Las células de microglía constituyen una población especializada de macrófagos residentes en el sistema nervioso central cuya proliferación es clave en la respuesta a daño cerebral (Vela et al., 2002). Además, se ha observado que como determinadas poblaciones de macrófagos residentes en tejido, la microglía muestra proliferación a nivel local con un papel considerable en el propio mantenimiento de la población (Gordon and Taylor, 2005). Para evaluar los efectos de LXR sobre la proliferación de este modelo celular, células de microglía primarias obtenidas a partir de la corteza cerebral de ratones neonatos fueron pretratadas durante 18 horas con T1317 (1 μ M), GW3965 (1 μ M) o vehículo seguido de un estímulo con L-cell cm (15% v/v) durante 24 horas. Los resultados mostraron que la activación de LXR también inhibe la proliferación en las células de microglía (Figura 11).

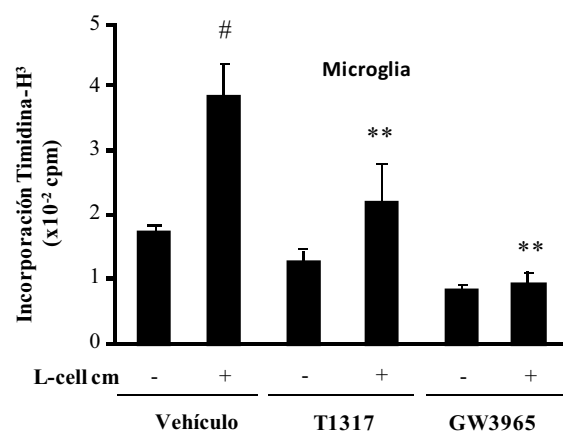


Figura 11.- Efectos antiproliferativos de LXR sobre células de microglía. Células de microglía primaria fueron incubadas durante 18h en DMEM 1%FCS en presencia o ausencia de los agonistas de LXR T1317 (1 μ M) o GW3965 (1 μ M). Entonces, las células fueron tratadas con

L-cell cm (15% v/v) durante 24h. La timidina fue añadida 6h antes de finalizar el experimento. La incorporación de timidina-H³ fue utilizada como indicador de proliferación. Se muestran los promedios de triplicados ±SD. **p<0,01 respecto a las células tratadas con M-CSF, #p<0,01 respecto a las células control (mediante test T-Student). Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes se muestra uno como representativo.

Con el propósito de conocer en profundidad la capacidad antiproliferativa de los agonistas de LXR sobre los macrófagos, las células fueron tratadas con el agonista T1317 a diferentes tiempos antes y después del estímulo con M-CSF (Figura 12A). Los efectos máximos de parada de la proliferación se observaron cuando las células fueron tratadas con el agonista de LXR antes del estímulo con M-CSF. Cuando la activación de LXR se llevó a cabo simultáneamente o 2 horas después del tratamiento con el factor de crecimiento aún observamos efectos inhibitorios sobre el ciclo celular. En cambio, cuando el ligando de LXR fue añadido 18 horas después del estímulo con M-CSF no disminuía la proliferación de los macrófagos.

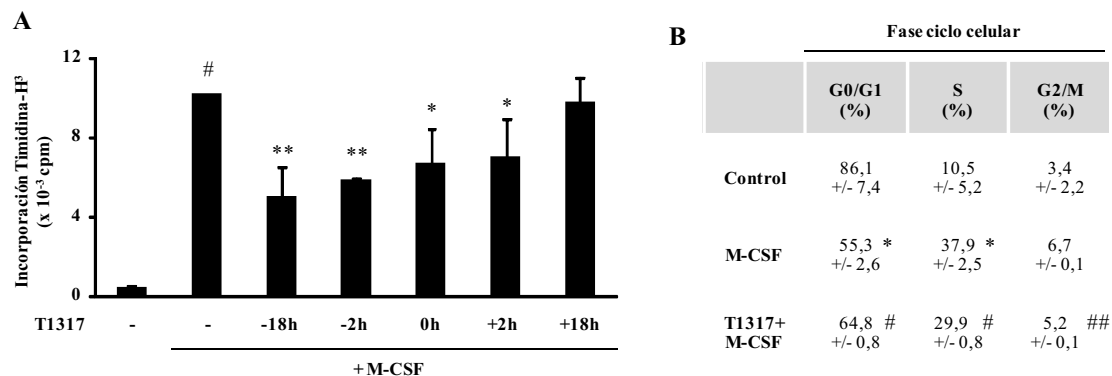


Figura 12.- A) Macrófagos quiescentes fueron tratados con T1317 (1µM) a diferentes tiempos antes (-) y después (+) del estímulo con rM-CSF (10ng/ml). Las células de control positivo fueron incubadas con rM-CSF en presencia de vehículo (DMSO). La timidina fue añadida 6h antes de finalizar el experimento. La incorporación de timidina-H³ fue utilizada como indicador de proliferación. Se muestran los promedios de triplicados ±SD. *p<0,05; **p<0,01 respecto a las células tratadas con M-CSF, #p<0,01 respecto a las células control (mediante test T-Student). B) Macrófagos quiescentes fueron tratados con T1317 (1µM) o vehículo 10h antes del estímulo con M-CSF durante 24h. El contenido de ADN fue determinado mediante citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio. Los valores promedio ± SD del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular fueron calculados a partir de triplicados. *p<0,05; **p<0,01 respecto a las células tratadas con M-CSF, #p<0,05; ##p<0,01 respecto a las células control (mediante test T-Student). En A) y B) las células de control negativo fueron mantenidas en medio sin M-CSF a lo largo de todo el experimento. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes.

También se llevaron a cabo estudios de distribución del ciclo celular mediante el análisis del contenido de ADN por citometría de flujo. Los resultados mostraron que el tratamiento con T1317 resulta en una acumulación de

células en la fase G_0/G_1 , con una inhibición de la transición a las fases S y G_2/M del ciclo celular (Figura 12B).

A continuación, evaluamos la contribución específica de cada una de las isoformas de LXR en los efectos antiproliferativos de los agonistas de LXR en macrófagos. Para ello, macrófagos derivados de médula ósea de ratones *wild-type* (WT), deficientes en $LXR\alpha$ ($LXR\alpha^{-/-}$), deficientes en $LXR\beta$ ($LXR\beta^{-/-}$) o deficientes en ambas isoformas ($LXR\alpha\beta^{-/-}$) se incubaron con agonistas de LXR durante 18 horas antes del estímulo con rM-CSF (24 horas) a diferentes concentraciones. Los resultados de incorporación de timidina- H^3 indican que los efectos inhibitorios de los agonistas de LXR se pierden completamente en macrófagos deficientes para ambos LXR (α y β), sin embargo, no sucede lo mismo en macrófagos deficientes en una única isoforma (Figura 13A), lo cual sugiere que ambas isoformas contribuyen a la inhibición de la proliferación mediada por agonistas de LXR en este modelo celular.

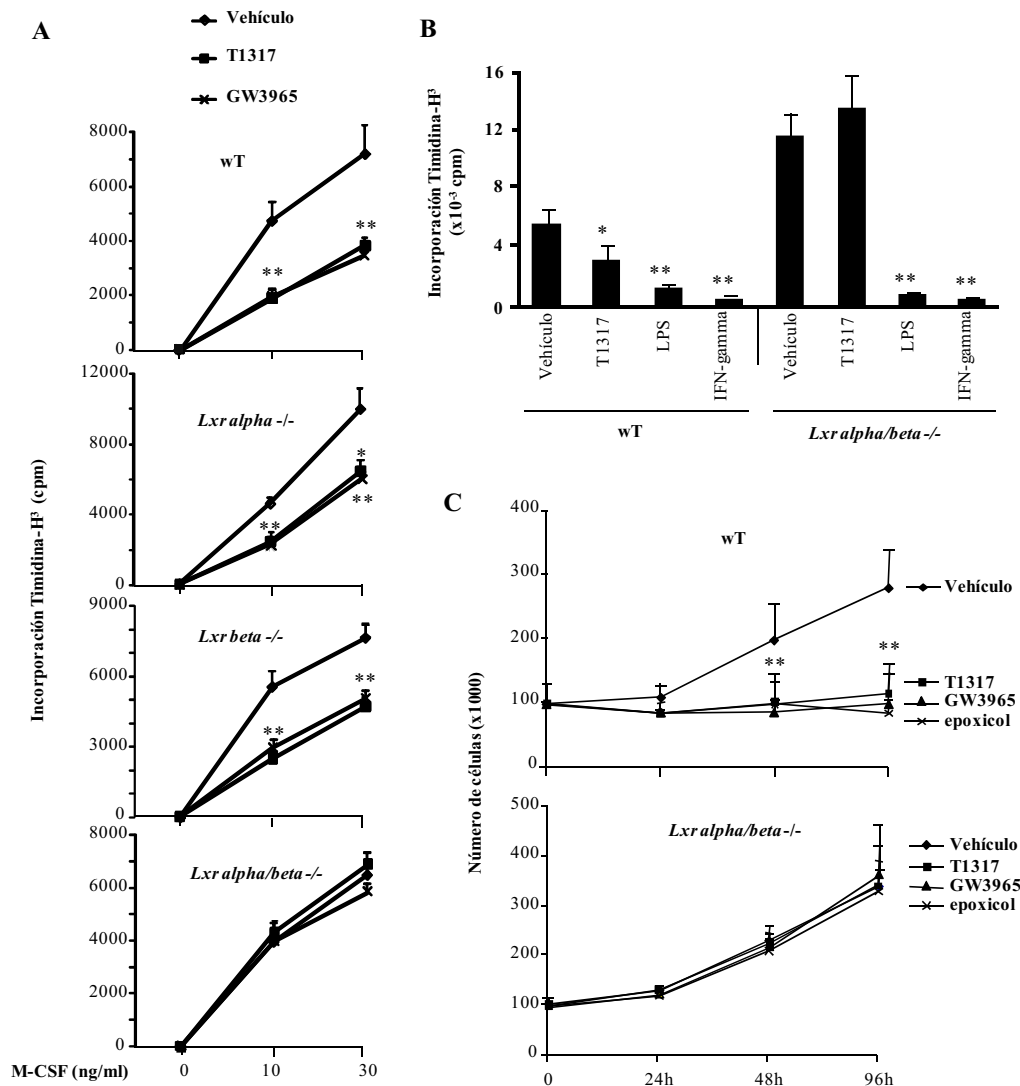


Figura 13.- Ambas isoformas de LXR (α y β) tienen capacidad de inhibir la proliferación de los macrófagos. A) Macrófagos wT, deficientes en LXR α (LXR α ^{-/-}), deficientes en LXR β (LXR β ^{-/-}) y deficiente en ambas isoformas (LXR α/β ^{-/-}) fueron incubados con T1317 o GW3965 (1 μ M) durante 18h y entonces estimulados con diferentes concentraciones de rM-CSF (24h). Están representados los promedios de triplicados. B) Macrófagos wT y LXR α/β ^{-/-} fueron incubados con LPS (100ng/ml), IFN- γ (10ng/ml) o T1317 (1 μ M) durante 18h y entonces estimulados con rM-CSF (10ng/ml) durante 24h. C) El conteo celular se llevó a cabo utilizando macrófagos wT y LXR α/β ^{-/-}. Las células fueron tratadas con L-cell cm (30% v/v) en presencia o ausencia de los agonistas de LXR T1317, GW3965 (1 μ M) o 24,25-epoxicolesterol (epoxicol; 10 μ M). Nuevos agonistas fueron añadidos a las células cada día. El número total de células fue determinado a los intervalos de tiempo indicados. Triplicados de cada condición fueron utilizados para calcular el promedio \pm SD. En A-C *p<0,05; **p<0,01 respecto a las células tratadas con M-CSF (mediante test T-Student). Las figuras muestran un experimento representativo de dos (C) o tres (A, B) experimentos independientes.

Confirmamos estos resultados mediante un test de conteo celular (Figura 13C). En este caso utilizamos macrófagos de ratones WT y LXR α/β ^{-/-}

preincubados con los agonistas sintéticos T1317 (1 μ M) o GW3965 (1 μ M), con el ligando endógeno 24,25-epoxicolesterol (epoxicol; 10 μ M) o vehículo durante 18 horas previo al estímulo con L-cell cm (30% v/v) durante 4 días.

Con el propósito de comprobar si los macrófagos de ratones deficientes en LXR (LXR $\alpha\beta$ -/-) presentaban alguna deficiencia en el mecanismo de parada del ciclo celular evaluamos los efectos del tratamiento con los factores proinflamatorios LPS e IFN- γ . Está descrito que estos factores activadores promueven una parada del ciclo celular en macrófagos (Xaus et al., 1999). Los macrófagos WT y LXR $\alpha\beta$ -/- fueron preincubados con LPS (100ng/ml), IFN- γ (10ng/ml) o T1317 (1 μ M) durante 18 horas seguido de un tratamiento con rM-CSF (10ng/ml) durante 24 horas. Los resultados de incorporación de timidina- H^3 mostraron que tanto LPS como IFN- γ inhiben la proliferación de macrófagos WT y LXR $\alpha\beta$ -/- (Figura 13B), sugiriendo que los macrófagos LXR $\alpha\beta$ -/- no han perdido la capacidad de parada del ciclo celular en respuesta a señales proinflamatorias.

1.2 Estudio del mecanismo molecular a través del cual LXR ejerce efectos antiproliferativos en macrófagos

La proliferación de los macrófagos en respuesta a M-CSF requiere la señalización a través de las MAPKs ERK-1, ERK-2 y JNK (Valledor et al., 1999, 2000). Dado que se ha demostrado que la activación de receptores nucleares afecta a la actividad de miembros de la familia de las MAPK (Díaz-Delfin et al., 2007; Crisafulli et al., 2010), comprobamos si los agonistas de LXR afectan a la actividad de ERK durante la respuesta de los macrófagos a M-CSF. Para ello, macrófagos quiescentes fueron estimulados con rM-CSF durante diferentes periodos de tiempo en presencia de vehículo o T1317. La activación de ERK se determinó a través de ensayos de Western Blot para detectar ERK-1/2 fosforilados. Observamos que el tratamiento con el factor de crecimiento aumenta la fosforilación de ERK-1/2 en núcleo y citoplasma. Esta fosforilación no se muestra afectada por la presencia de los ligandos de LXR (Figura 14A).

También analizamos la actividad de la quinasa JNK mediante un ensayo quinasa *in vitro* utilizando GST-C-JUN como sustrato. Los resultados muestran que los agonistas de LXR no inhiben la actividad de JNK (Figura

14B). La falta de efectos de los agonistas sobre las quinasas ERK-1/2 y JNK sugiere que el mecanismo de acción que media la parada del ciclo por LXR no está relacionado con la disminución de la actividad de estas cascadas de señalización tempranas. Estas observaciones concuerdan con la capacidad de T1317 de inhibir la proliferación incluso cuando se suministra 2 horas después del tratamiento con M-CSF.

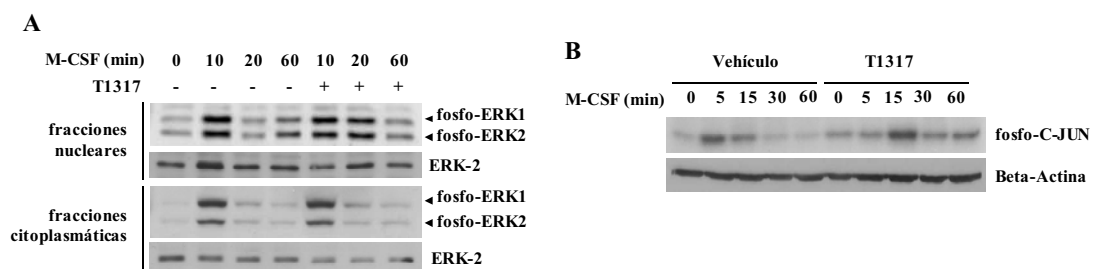


Figura 14.- La activación de LXR no afecta a la fosforilación de ERK1 y -2 y tampoco a la actividad de JNK. Macrófagos quiescentes fueron tratados con rM-CSF durante diferentes periodos de tiempo en presencia de vehículo o T1317 (1µM). En A, la activación de ERK fue determinada por Western Blot utilizando anti-ERK-1/2 difosforilado. ERK-2 total fue determinado como control. En B, la actividad JNK fue determinada mediante un ensayo quinasa *in vitro* utilizando GST-C-JUN como sustrato. La cantidad de β-Actina fue analizada por Western Blot como control de los niveles totales de proteína. En A y B se llevaron a cabo tres experimentos independientes. La figura muestra un experimento representativo.

AIM/Spα es un factor inhibidor de la apoptosis miembro de la superfamilia de receptores *scavenger* ricos en cisteína que está regulado positivamente por los agonistas de LXR en macrófagos (Joseph et al., 2004; Valledor et al., 2004). Se ha observado que AIM/SPα en combinación con TGFβ media la inhibición de la proliferación en linfocitos B (Yusa et al., 1999). Por eso, consideramos la posibilidad de que AIM jugara un papel mediando la actividad antiproliferativa de LXR.

Utilizamos como fuente de AIM el sobrenadante de células HEK293 que sobreexpresan AIM murino. Los sobrenadantes control se obtuvieron de células transfectadas con el vector vacío. En los experimentos con el sobrenadante de AIM no observamos inhibición de la proliferación (Figura 15A), con lo cual, podríamos descartar AIM como mediador de los efectos antiproliferativos de LXR. Como control analizamos los efectos de AIM sobre la muerte celular de macrófagos en condiciones de privación de factores de crecimiento. Para ello, los macrófagos fueron privados o tratados con rM-CSF

(20ng/ml) durante 36 horas en presencia de sobrenadante control de células HEK-293 EBNA o sobrenadante con alto contenido en rAIM. El análisis de la muerte celular fue llevado a cabo determinando el porcentaje de células muertas con contenido de ADN sub-G₀/G₁ tras teñir las células con yoduro de propidio. Los resultados muestran un aumento de la supervivencia en respuesta a la privación de M-CSF, como queda reflejado en el porcentaje subG₀/G₁ (Figura 15B). Este efecto antiapoptótico corrobora efectos anteriores observados por miembros de nuestro grupo (Valledor et al., 2004).

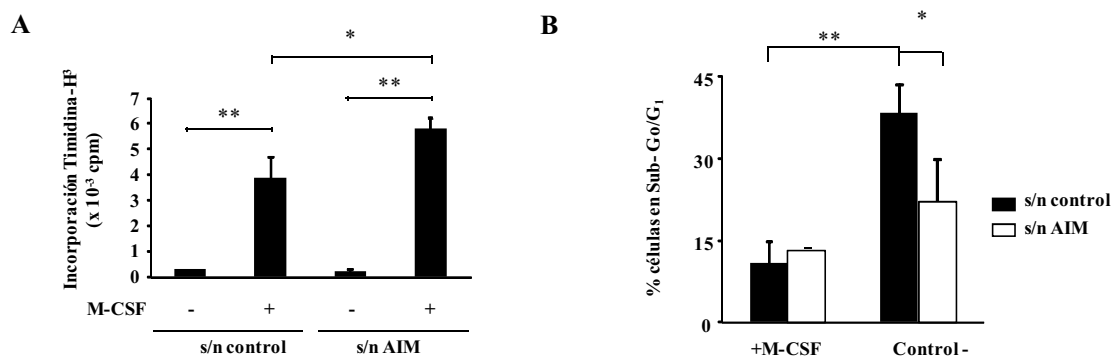


Figura 15.- Los agonistas de LXR inhiben la proliferación de los macrófagos de forma independiente de AIM. A) Macrófagos quiescentes fueron tratados durante 18h con sobrenadante control de células HEK-293 EBNA o sobrenadante con alto contenido en rAIM y entonces estimulados con rM-CSF durante 24h. La timidina fue añadida las últimas 6h de tratamiento y la proliferación celular fue determinada en triplicados. Los gráficos muestran el promedio de los valores de incorporación de timidina \pm SD de triplicados. B) Los macrófagos fueron privados o tratados con rM-CSF (20ng/ml) durante 36h en presencia de sobrenadante control de células HEK-293 EBNA o sobrenadante con alto contenido en rAIM. El porcentaje de células muertas con contenido de ADN sub-G₀/G₁ fue determinado mediante citometría de flujo por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (mediante test T-Student).

A continuación, analizamos la expresión de moléculas involucradas en la regulación del ciclo celular mediante Western blot y PCR a tiempo real. M-CSF regula positivamente la expresión proteica de varias ciclinas y CDKs tal como demuestran los ensayos de Western Blot (Figura 16A). La activación de LXR resulta en una inhibición de la expresión proteica de las ciclinas CCND1 y B1 y de las quinasas CDK2 y 4. También observamos efectos inhibitorios del agonista de LXR sobre la expresión a nivel de ARNm de CcnB1 a tiempos largos de tratamiento con M-CSF (Figura 16B). En cambio, la expresión de mRNA de CcnD1, Cdk2 o Cdk4 no está inhibida de forma significativa, lo cual

sugiere que la disminución a nivel de proteína de estas moléculas no es resultado de una represión directa de sus genes mediada por LXR.

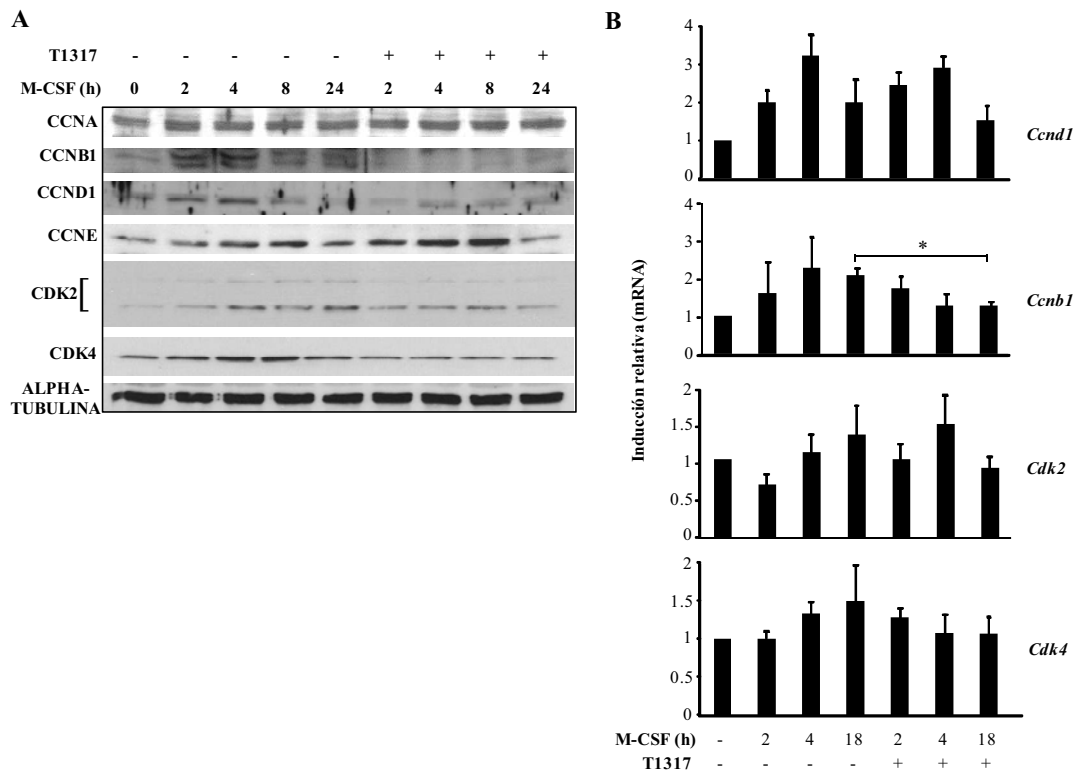


Figura 16.- Los niveles de proteína de CCND1 y B1 y CDK2 y 4 están regulados negativamente por la activación de LXR. A) Macrófagos quiescentes fueron incubados con rM-CSF (20ng/ml) durante los diferentes periodos de tiempo indicados en presencia o ausencia de T1317 (1µM). La expresión de diversas ciclinas y CDKs fue evaluada por Western blot utilizando anticuerpos específicos. Resultados equivalentes se observaron en cuatro experimentos independientes. B) Macrófagos quiescentes fueron incubados con rM-CSF (20ng/ml) durante los diferentes periodos de tiempo indicados en presencia o ausencia de T1317 (1µM). El análisis de los niveles de mRNA de CcnD1 y B1 y Cdk2 y 4 fue llevado a cabo mediante PCR a tiempo real. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados con los niveles de expresión de la proteína ribosomal L14 y representados en forma de inducción relativa ± SEM de tres experimentos independientes. *p<0,01 (mediante test T-Student).

Otra posibilidad que analizamos fue la implicación de la proteína S phase kinase-associated protein 2 (SKP2) en la parada de ciclo celular mediada por LXR. SKP2 es una proteína involucrada en la degradación del inhibidor de ciclo celular p27KIP1 que en células vasculares del tejido muscular liso y células de cáncer de próstata está regulado negativamente por LXR (Blaschke et al., 2004; Chuu et al., 2007). Analizamos la expresión a nivel de mRNA de Skp2 tras la activación de LXR en macrófagos pero no observamos cambios

(Figura 17A). Además, ensayos de proliferación llevados a cabo en macrófagos procedentes de ratones *wild-type* (WT) y deficientes en p27KIP1 (*p27Kip1*^{-/-}) mostraron que los agonistas de LXR ejercen efectos antiproliferativos en ambos casos (Figura 17C). Estos resultados indican que los efectos mediados por LXR sobre la proliferación de macrófagos son independientes de p27KIP1.

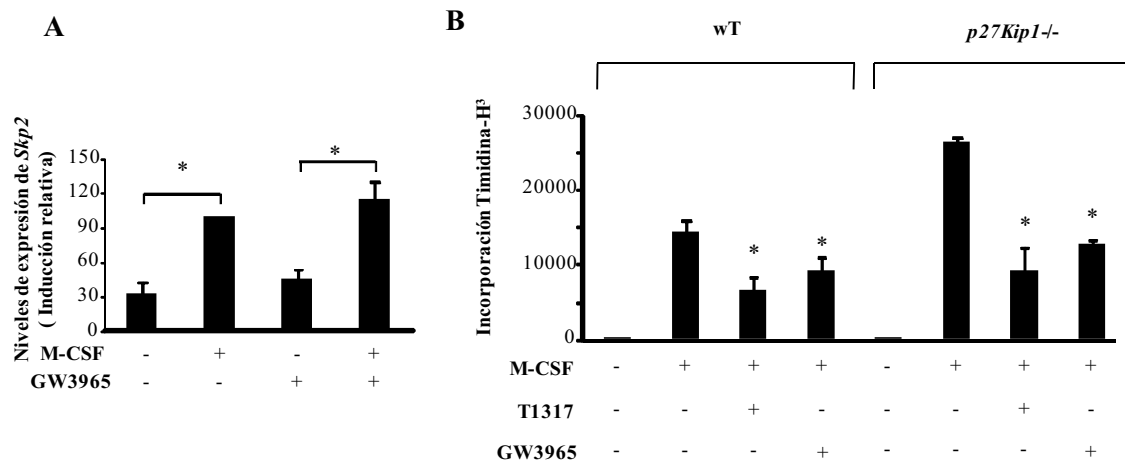


Figura 17.- Los efectos antiproliferativos de LXR son independientes de p27. A) Macrófagos quiescentes fueron pre-estimulados con GW3965 (1µM) o vehículo y entonces tratados con rM-CSF (20ng/ml) durante 6h. El análisis de la expresión de Skp2 fue llevado a cabo mediante PCR a tiempo real. El gráfico muestra la media de los niveles de inducción del mRNA de Skp2 ± SEM de tres experimentos independientes. *p<0,01 (mediante test T-Student). B) Macrófagos derivados de ratones wT y deficientes en p27KIP1 (*p27Kip1*^{-/-}) fueron tratados con rM-CSF (20ng/ml) en presencia de T1317 (1µM), GW3965 (1µM) o vehículo (DMSO). La timidina H³ fue añadida 6h antes de la finalización del experimento. La incorporación de timidina-H³ fue utilizada como medida de la proliferación. La media de los valores ± SD fue calculada a partir de dos experimentos biológicos llevados a cabo en triplicados. *p<0,01 respecto al tratamiento con M-CSF (mediante test T-Student).

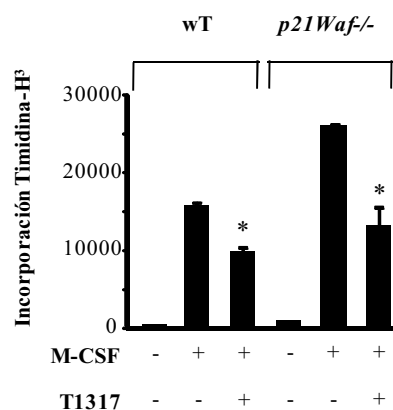


Figura 18.- Los efectos antiproliferativos de LXR son independientes de p21. Macrófagos derivados de ratones wT y deficientes en p21WAF (*p21Waf*^{-/-}) fueron tratados con rM-CSF

(20ng/ml) en presencia de T1317 (1µM) o vehículo (DMSO). La timidina H³ fue añadida 6h antes de la finalización del experimento. La incorporación de timidina-H³ fue utilizada como indicador de proliferación. La media de los valores ± SD fue calculada a partir de dos experimentos biológicos llevados a cabo en triplicados. *p<0,01 respecto al tratamiento con M-CSF (mediante test T-Student).

En el caso de p21Waf1, otro inhibidor del ciclo celular, obtuvimos resultados similares. Ensayos de proliferación con macrófagos procedentes de ratones *wild-type* (WT) y deficientes en p21WAF1 (p21Waf1^{-/-}) mostraron que los ligandos de LXR tienen capacidad de parar el ciclo independientemente de p21Waf1 (Figura 18).

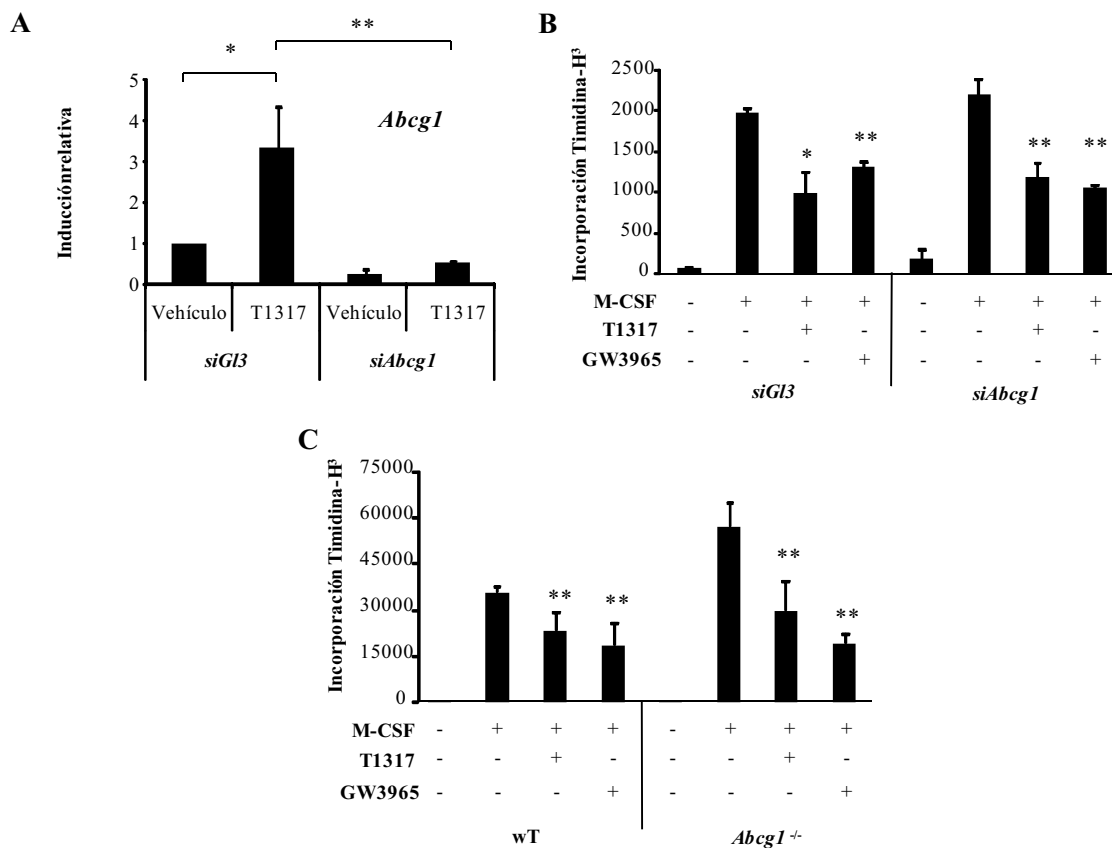


Figura 19.- Los agonistas de LXR inhiben la proliferación de los macrófagos en ausencia de Abcg1. Macrófagos de diferentes orígenes fueron tratados con rM-CSF (20ng/ml) en presencia o ausencia de T1317 (1µM) o GW3965 (1µM) durante 24h. Las células control fueron tratadas con vehículo (DMSO). A) Los macrófagos fueron transfectados previamente con siRNA contra Abcg1 (siAbcg1) o luciferasa (siG13). Los niveles de expresión de Abcg1 fueron determinados mediante PCR a tiempo real. *p<0,05; **p<0,01 (mediante test T-Student). B) Los macrófagos fueron transfectados previamente con siRNA contra Abcg1 (siAbcg1) o luciferasa (siG13). La proliferación se determinó mediante incorporación de timidina-H³. Resultados similares se obtuvieron en cuatro experimentos independientes. C) Los macrófagos fueron

obtenidos de ratones wT o deficientes en ABCG1 (*Abcg1*^{-/-}). La proliferación se determinó mediante incorporación de timidina-³H. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos llevados a cabo en triplicados. En B y C **p*<0,05; ***p*<0,01 respecto al tratamiento con M-CSF correspondiente (mediante test T-Student).

En linfocitos T se ha descrito que LXR regula negativamente la proliferación a través de la inducción del transportador de colesterol ABCG1 (Bensinger et al., 2008). La hipótesis de los autores es que cambios en la compartimentalización intracelular de los esteroides podría ser detectada por los componentes de la maquinaria de ciclo celular y que, en determinados casos, se interpretaría como una condición inapropiada para la división celular. Nosotros analizamos si alteraciones en la expresión de moléculas clave involucradas en la homeostasis de colesterol afectan a la capacidad de LXR de inhibir la proliferación en macrófagos. En primer lugar evaluamos los efectos de *Abcg1* mediante la utilización de siRNA para disminuir su inducción por la activación de LXR (Figura 19A). Ensayos de proliferación en respuesta a M-CSF no mostraron cambios en la capacidad de T1317 o GW3965 para inhibir la proliferación celular en presencia de siRNA contra *Abcg1* (Figura 19B). También llevamos a cabo estudios de proliferación con macrófagos procedentes de ratones deficientes para *Abcg1* (*Abcg1*^{-/-}) que confirmaron los resultados obtenidos mediante siRNA (Figura 19C). Curiosamente, los macrófagos *Abcg1*^{-/-} mostraron niveles más altos de proliferación en respuesta a M-CSF, pero aún así la activación de LXR inhibió significativamente la proliferación de estas células.

A continuación, evaluamos la posible implicación del transportador de colesterol ABCA1. Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo utilizando siRNA contra *Abca1* (Figura 20A) y también macrófagos procedentes de ratones deficientes para esta proteína (Figura 20C). De forma parecida a lo observado en macrófagos deficientes para *Abcg1*, las células deficientes para *Abca1* mostraron una mayor respuesta proliferativa pero la activación de LXR sigue inhibiendo esta proliferación.

Con el objetivo de inhibir simultáneamente la expresión de ambos transportadores, ABCA1 y ABCG1, utilizamos dos procedimientos diferentes. Por un lado, utilizamos siRNA contra *Abca1* en células deficientes para *Abcg1* (Figura 20D) y, por otro lado, tratamos a macrófagos deficientes para *Abcg1*

con probucol, un inhibidor de ABCA1 (Figura 20B). En ambos casos, la capacidad de los agonistas de LXR para inhibir la proliferación de los macrófagos no se muestra bloqueada.

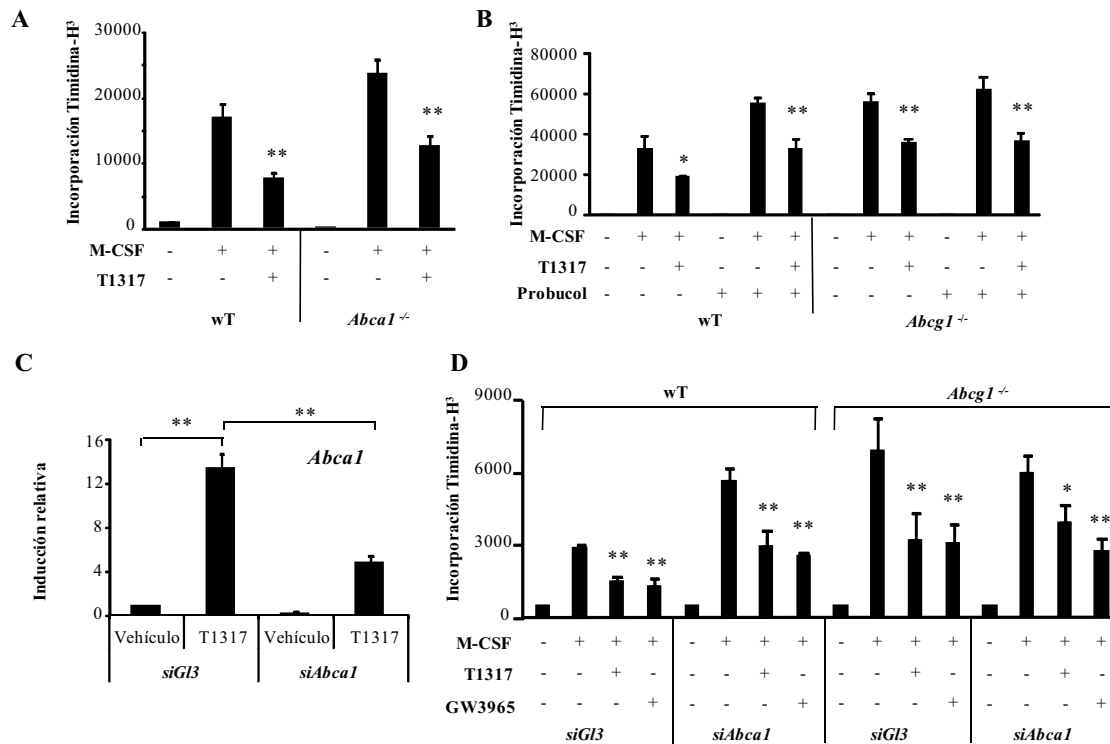
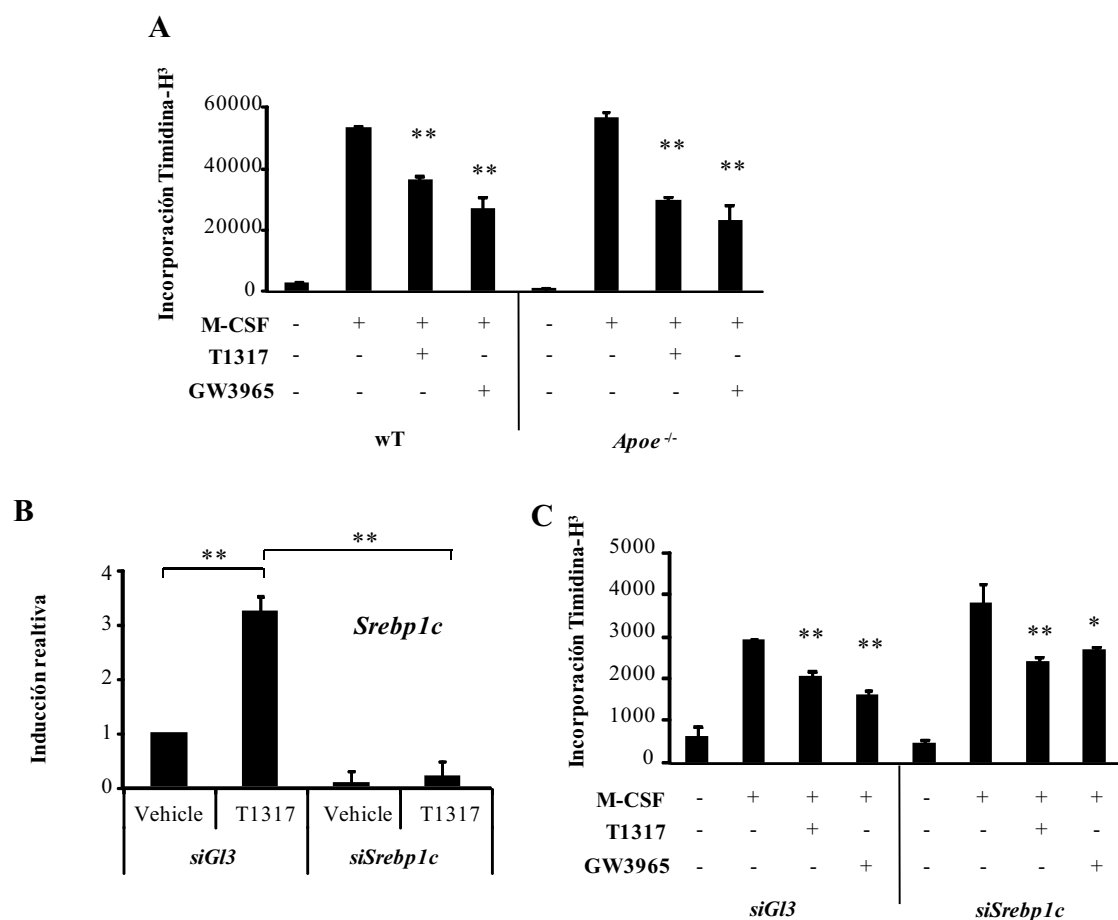


Figura 20.- Efectos antiproliferativos de LXR en ausencia de Abca1 y Abcg1. Macrófagos de diferentes orígenes fueron tratados con rM-CSF (20ng/ml) en presencia o ausencia de T1317 (1µM) o GW3965 (1µM) durante 24h. Las células control fueron tratadas con vehículo (DMSO). A) Los macrófagos fueron obtenidos de ratones wT o deficientes en ABCA1 (Abca1^{-/-}). B) Macrófagos de ratones wT o Abcg1^{-/-} fueron tratados con rM-CSF en presencia o ausencia de T1317 y/o probucol (20µM). C) Los macrófagos fueron transfectados previamente con siRNA contra Abca1 (siAbca1) o luciferasa (siGL3). Los niveles de expresión de Abca1 fueron determinados mediante PCR a tiempo real. **p<0,01 (mediante test T-Student). D) Macrófagos derivados de ratones wT o Abcg1^{-/-} fueron transfectados con siRNA contra Abca1 (siAbca1) o luciferasa (siGL3). En A-B y C, la proliferación se determinó mediante incorporación de timidina-H³. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos llevados a cabo en triplicados. *p<0,05; **p<0,01 respecto al tratamiento con M-CSF correspondiente (mediante test T-Student).

Finalmente, evaluamos la implicación de otros dos genes diana de LXR, ApoE y Srebp1c, que juegan un papel importante en la homeostasis lipídica. En el caso de ApoE los ensayos de proliferación se llevaron a cabo utilizando macrófagos deficientes en esta proteína. En el caso de Srebp-1c utilizamos siRNA contra Srebp-1c para silenciar su expresión. En ambos casos, los

agonistas de LXR inhiben la proliferación de los macrófagos en respuesta a M-CSF (Figura 21).

El conjunto de resultados sugiere que los macrófagos tienen mayor capacidad proliferativa en condiciones en las que se disminuye la expresión de ABCA1 o ABCG1. Sin embargo, los agonistas de LXR siguen teniendo capacidad de inhibir la proliferación en estas condiciones, lo cual nos indicaría que LXR afecta a la expresión de determinadas ciclinas y CDKs y a la proliferación de los macrófagos independientemente de los cambios en el tráfico de colesterol



provocados por la inducción de ABCA1 o ABCG1.

Figura 21.- La activación de LXR inhibe la proliferación de los macrófagos en ausencia de ApoE o Srebp1c. Macrófagos de diferentes orígenes fueron tratados con rM-CSF (20ng/ml) en presencia o ausencia de T1317 (1µM) o GW3965 (1µM). Las células control fueron tratadas con vehículo (DMSO). A) Los macrófagos se obtuvieron de ratones wT o deficientes en ApoE (ApoE^{-/-}). La proliferación se determinó mediante incorporación de timidina-H³. B) Los macrófagos fueron transfectados con siRNA contra Srebp1c (siSrebp1c) o luciferasa (siGL3). Los niveles de expresión de Srebp-1c fueron determinados mediante PCR a tiempo real. **p<0,01 (mediante test T-Student). C) Los macrófagos fueron transfectados con siRNA contra Srebp1c (siSrebp1c) o

luciferasa (siGL3). La proliferación se determinó mediante incorporación de timidina- H^3 . En A y C, se obtuvieron resultados similares en dos experimentos llevados a cabo en triplicados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto al tratamiento con M-CSF correspondiente (mediante test T-Student).

1.3 Efectos de los ligandos de LXR en la proliferación de macrófagos en un modelo de peritonitis

Con el objetivo de comprobar si los agonistas de LXR ejercen acciones antiproliferativas en macrófagos *in vivo*, pusimos a punto un modelo murino de peritonitis en el que poder observar los efectos en la proliferación de los macrófagos. Estudios previos en nuestro laboratorio demuestran que los macrófagos procedentes de peritonitis inducida mediante Concanavalina A (ConA) tienen capacidad proliferativa. Cabe decir que en otro modelo de peritonitis inducida con tioglicolato los macrófagos pierden la capacidad de respuesta a estímulos proliferativos. Para poder inducir la proliferación de los macrófagos peritoneales *in vivo* llevamos a cabo una inyección intraperitoneal de L-cell cm (5%). La activación de LXR se llevó a cabo a través de 2 inyecciones intraperitoneales con T1317 (10mg/kg) 18 horas antes y simultáneamente al estímulo proliferativo. Las células peritoneales se tiñeron con yoduro de propidio para el análisis por citometría de flujo del contenido en ADN. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo para aquella población celular que expresaba el marcador de superficie F4/80 característico de macrófagos. Observamos un aumento del porcentaje de células en la fase S del ciclo celular como respuesta a la inyección de L-cell cm *in vivo* (Figura 22). Este porcentaje de células en fase S se reduce significativamente en los ratones tratados con T1317.

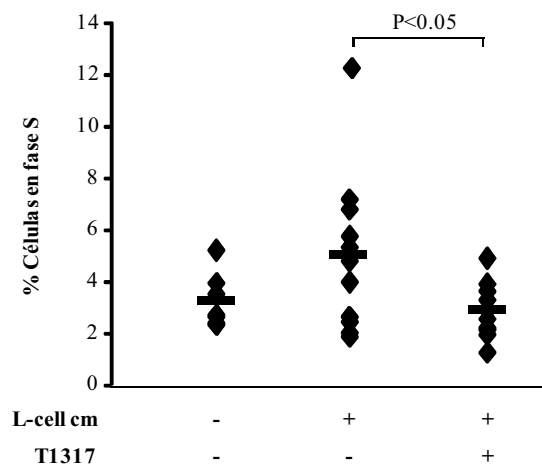


Figura 22.- La activación de LXR inhibe la respuesta proliferativa de los macrófagos *in vivo*. Las células peritoneales se obtuvieron a partir de un modelo de peritonitis inducida por ConA. 3 días después de la inyección con ConA, los ratones fueron inyectados con L-cell cm 5% como fuente de M-CSF murino. Los animales control fueron inyectados con DMEM solo. La activación de LXR fue inducida mediante dos inyecciones i.p. de T1317 (10mg/kg/inyección). La población de macrófagos (que expresan F4/80) fue seleccionada y su contenido de ADN fue determinado por tinción con yoduro de propidio. El porcentaje de células en fase S de cada animal está representado con diamantes. Los valores promedio de cada grupo se representan como barras horizontales. Animales control, n=7; animales tratados con L-cell cm solo, n=12; animales tratados con T1317 y L-cell cm, n=10. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test U de Wilcoxon/Mann-Whitney.

2 Estudio del papel de los Liver X Receptors en la activación por IFN- γ de macrófagos y microglía.

2.1 Efecto represor de LXR sobre la activación por IFN- γ de macrófagos y microglía

En estudios previos al desarrollo de esta tesis pudimos observar que la activación de LXR ejercía efectos inhibitorios sobre la inducción por IFN- γ de la expresión de determinados genes inflamatorios.

Con el objetivo de evaluar los programas transcripcionales regulados por el agonista de LXR GW3965 durante la activación de macrófagos por IFN- γ llevamos a cabo un estudio masivo de regulación de expresión génica mediante la utilización de microarrays de expresión. Para ello, macrófagos derivados de médula ósea fueron estimulados con GW3965 (2 μ M) o vehículo (DMSO) en medio DMEM suplementado con 1% de FCS durante 18 horas seguido de un tratamiento con IFN- γ (5ng/ml) durante 6 horas. Las células control fueron tratadas únicamente con DMSO. Dos réplicas biológicas independientes fueron sometidas a este análisis.

El microarray utilizado fue Mouse 430 2.0 GeneChip de Affymetrix. La estimación de la expresión de los diferentes genes se calculó a partir del algoritmo WPP (Auer et al., 2007). Estas estimaciones generadas por WPP representan un valor en log₂. Todos los resultados se muestran en relación a la expresión en las células control. Para ello, a los valores de expresión obtenidos en los diferentes tratamientos se les substrajo el valor de expresión de las células control. Se generó un mapa cromático mediante el programa CIMMiner (<http://discover.nci.nih.gov/cimminer/>) que muestra todos aquellos genes que están regulados positiva o negativamente por IFN- γ (Figura 23A). Consideramos que un gen está regulado positivamente por IFN- γ cuando la relación entre su expresión en macrófagos activados por IFN- γ y macrófagos control es superior o igual a 1. Consideramos que un gen está regulado negativamente por IFN- γ cuando la relación entre su expresión en macrófagos activados por IFN- γ y macrófagos control es inferior o igual a -1. En la parte inferior del mapa cromático aparecen representados los genes diana de LXR Abca1, Abcg1 y SREBP1c como control de la actividad de GW3965.

A la hora de evaluar los efectos de GW3965 sobre la respuesta a IFN- γ consideramos reprimidos por el agonista de LXR aquellos genes cuya expresión se encuentra disminuida un 30% o más y consideramos inducidos por el agonista de LXR aquellos genes cuya expresión se encuentra aumentada un 100% o más. Acorde con estas consideraciones, observamos que por un lado GW3965 reprime el 38% de los genes inducidos por IFN- γ y por otro lado, regula positivamente la expresión de un 7% de los genes reprimidos por IFN- γ .

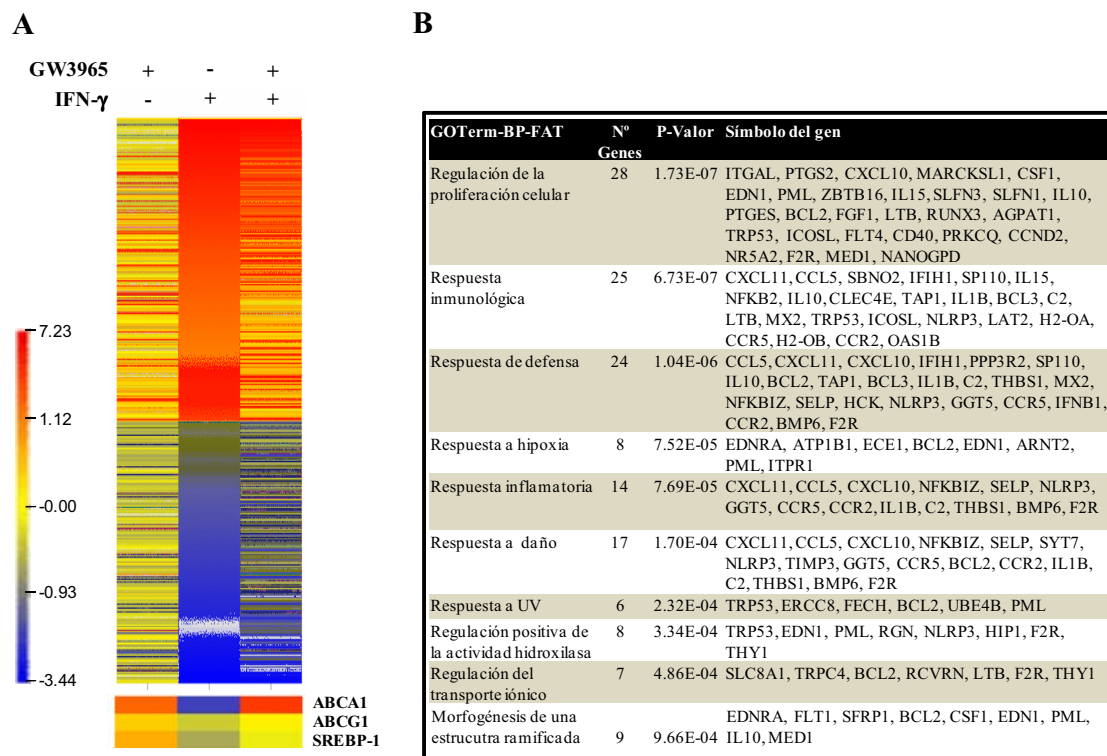


Figura 23.- La activación de LXR inhibe el 38% de la respuesta transcripcional de los macrófagos a IFN- γ . A) Los efectos globales del agonista de LXR GW3965 sobre la expresión de genes modulados por IFN- γ fueron evaluados mediante arrays de expresión génica. Los macrófagos fueron preincubados con GW3965 (2 μ M) o vehículo (DMSO) durante 18h y entonces estimulados o no con IFN- γ (5ng/ml) durante 6h. Las células control fueron tratadas con vehículo a lo largo de todo el experimento. Para cada tratamiento se calculó el promedio de los valores de inducción relativa (respecto a las células control) de dos experimentos independientes (escala log2). Los genes inducidos (dos veces o más) o reprimidos (dos veces o más) por IFN- γ fueron seleccionados para construir un mapa cromático. Cambios positivos (naranja) o negativos (azul) en la expresión respecto a las células control se muestran para cada tratamiento. Como control de la actividad de LXR, la inducción relativa de tres genes diana de LXR bien caracterizados, Abca1, Abcg1 y Srebp-1c, se muestran en el panel inferior. B) El análisis de GO de la lista de genes regulados positivamente por IFN- γ y reprimidos por GW3965 muestra enriquecimiento (<1,5) de diversos procesos biológicos.

Con el fin de conocer las funciones de los genes que IFN- γ induce y GW3965 reprime llevamos a cabo un análisis funcional de este grupo de genes mediante DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang et al., 2009b). DAVID

es una herramienta bioinformática que nos permite un análisis basado en la anotación del Consorcio Gene Ontology (GO) agrupando aquellos genes con la misma función. El análisis determina si existen funciones enriquecidas en el grupo de genes seleccionado (genes regulados positivamente por IFN- γ y negativamente por GW3965) respecto a la totalidad de genes del genoma murino. Para evaluar la significatividad del enriquecimiento de cada función utiliza un Test Exacto de Fisher modificado del que se obtiene un P-valor (o EASE score). Los resultados obtenidos se muestran a través de una tabla (Figura 23B) en la que aparecen aquellas funciones con un “P-valor” menor a 0,01. En la columna contigua al nombre de la categoría mostramos el número de genes de nuestra lista que están incluidos en dicha categoría, los nombres de estos genes se especifican en la última columna.

Llevamos a cabo una tabla (tabla 3) en la que se muestran los resultados del microarray para aquellos genes implicados en la presentación de antígeno de clase I y II. La mayor parte de estos genes no muestran inducción en estas condiciones de 6 horas de estímulo con IFN- γ . Sí observamos inducción de los genes Tap1, CII α y Ctsh, la expresión de estos genes muestra cierta represión en presencia de GW3965 pese a que en un porcentaje menor del 30%.

Presentación de antígeno de clase I				
		GW-Ctl	IFN-Ctl	GWIFN-Ctl
Psmb8	proteasome subunit, beta type 8	0,083	1,067	0,864
Psmb9	proteasome subunit, beta type 9	-0,455	1,596	1,634
Psm10	proteasome 26S subunit, non-ATPase, 10	0,294	0,549	0,255
Psm2	proteasome 28 subunit, beta	-0,173	1,163	1,101
Tap1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B	-0,430	2,385	2,298
H2-K1	Histocompatibility 2, K1, K region	-0,101	0,370	0,208
B2m	beta-2 microglobulin	-0,072	0,663	0,480
Tapbp	TAP binding protein	-0,061	0,316	0,256
Presentación de antígeno de clase II				
		GW-Ctl	IFN-Ctl	GWIFN-Ctl
H2-Aa	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	-0,087	0,625	0,465
H2-Ab1	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	-0,251	1,039	0,702
H2-DMa	histocompatibility 2, class II, locus DMa	-0,360	1,854	1,656
H2-DMb1	histocompatibility 2, class II, locus Mb1	-0,300	1,618	1,454
H2-DMb2	histocompatibility 2, class II, locus Mb2	0,989	1,293	1,381
H2-Ea	histocompatibility 2, class II antigen E alpha	-0,126	1,021	0,729
H2-Eb1	histocompatibility 2, class II antigen E beta	-0,212	0,818	0,551
CIIta	class II transactivator	-0,456	3,322	3,075
Cd74	CD74 antigen	-0,142	0,533	0,404
Ctsb	Cathepsin B	0,037	-0,328	-0,094
Ctsh	cathepsin H	-0,284	2,152	1,918
Ctsl	cathepsin L	-0,083	-0,474	-0,336

Tabla 3. Genes de respuesta a IFN- γ implicados en la presentación de antígeno.

Para caracterizar los efectos inhibitorios de LXR sobre la señal de IFN- γ llevamos a cabo ensayos de transrepresión en los que los macrófagos fueron pretratados durante 18 horas con diferentes dosis del agonista de LXR antes del estímulo con IFN- γ . Para el posterior análisis mediante PCR a tiempo real, tanto en este caso como en posteriores experimentos, seleccionamos varios genes involucrados en la respuesta inmunológica que se muestran reprimidos por GW3965 en el estudio de microarray. También incluimos el gen de la sintasa inducible de óxido nítrico (NOS2), ya que se trata de una diana de transrepresión de LXR en experimentos llevados a cabo con LPS (Ghisletti et al., 2007). Los resultados muestran que GW3965 inhibe la expresión de genes inducida por IFN- γ de manera dependiente de dosis (Figura 24).

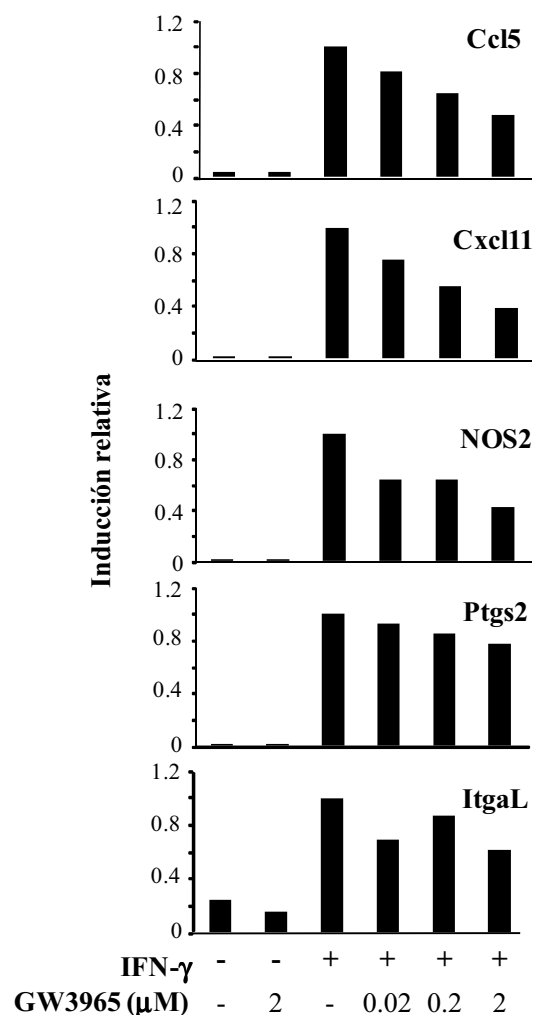


Figura 24.- GW3965 regula negativamente la expresión de genes inducidos por IFN- γ de manera dependiente de dosis. Macrófagos derivados de médula ósea fueron preincubados con diferentes dosis de GW3965 durante 18h y entonces estimulados con IFN- γ (5ng/ml) durante 6h. Se extrajo el ARN total y la expresión génica fue evaluada mediante PCR a tiempo real y

normalizada por los niveles de expresión de L14. Los valores de inducción relativa fueron calculados utilizando como referencia los valores de expresión de las células estimuladas con IFN- γ (en ausencia de agonistas de LXR). Resultados similares fueron obtenidos en dos experimentos independientes y se muestra un experimento representativo.

Por otro lado, macrófagos procedentes de ratones WT y LXR α/β -/- fueron pretratados con T1317, GW3965 o vehículo durante diferentes periodos de tiempo antes del estímulo con IFN- γ . Los resultados muestran una represión máxima en preincubaciones cortas con los agonistas de LXR sobre los genes *Ccl5* y *Nos2*, que se mantiene en el transcurso del experimento (Figura 25). En cambio, pretratamientos más prolongados con los agonistas de LXR aumentan la represión sobre los genes *Cxcl10* y *Cxcl11*. No observamos transrepresión de estos genes en las células deficientes en LXR.

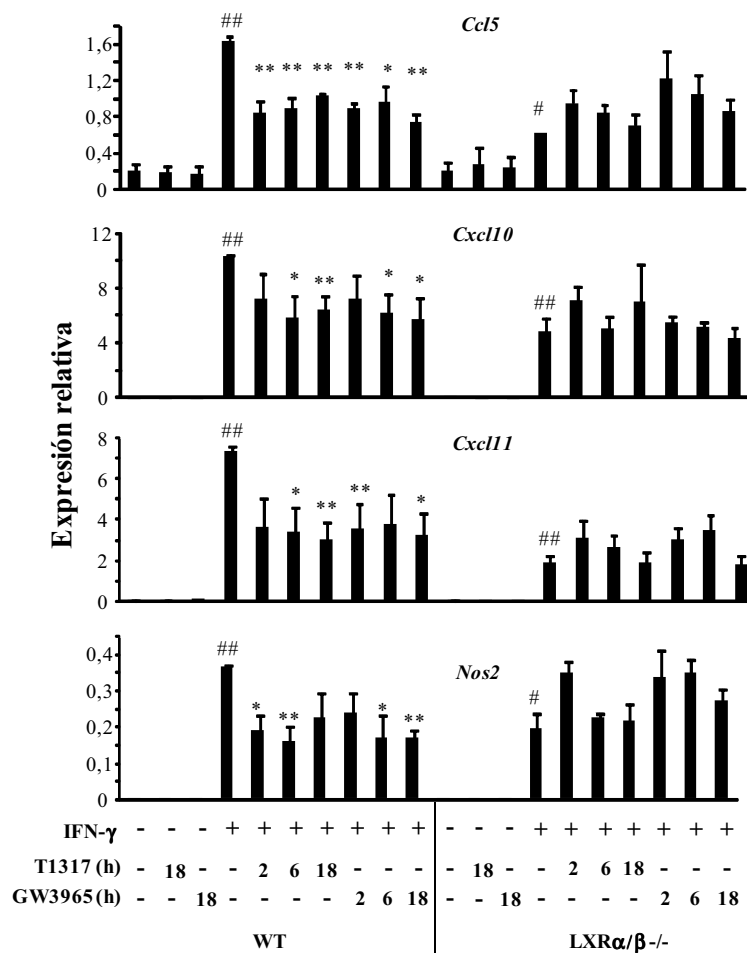


Figura 25.- Inhibición de la respuesta a IFN- γ mediada por LXR a diferentes tiempos.

Macrófagos procedentes de ratones *wild-type* (WT) y deficientes en LXR (LXR α/β -/-) fueron preincubados con T1317 (2 μ M) o GW3965 (2 μ M) durante los periodos de tiempo indicados y entonces estimulados con IFN- γ (5ng/ml) durante 6h. Se extrajo el ARN total y la expresión

génica fue evaluada mediante PCR a tiempo real y normalizada por los niveles de expresión de L14. Los gráficos muestran el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis de la significatividad estadística se llevó a cabo mediante el test T-Student. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ respecto a las células no tratadas; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto a las células tratadas con IFN- γ (en ausencia de agonista de LXR).

Con el objetivo de comprobar si la disminución en la expresión a nivel de ARNm se correspondía con una disminución a nivel de proteína llevamos a cabo un ensayo de Western blot. Para ello, los macrófagos fueron preincubados durante 18 horas en presencia de GW3965 y tratados con IFN- γ durante 24 horas antes de llevar a cabo la extracción de proteína. El análisis de la expresión a nivel de proteína de NOS2 mostró un aumento tras el estímulo con IFN- γ que se veía disminuido en presencia del agonista GW3965 (Figura 26).

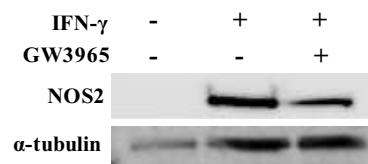


Figura 26.- GW3965 regula negativamente la inducción de NOS2 por IFN- γ a nivel de proteína. Macrófagos derivados de médula ósea fueron preincubados con GW3965 (2 μ M) durante 18h y entonces estimulados con IFN- γ (5ng/ml) durante 24h. Se extrajo la proteína total y la expresión de NOS2 se analizó mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. La expresión de α -tubulina se utilizó como control para la carga y la transferencia de proteína.

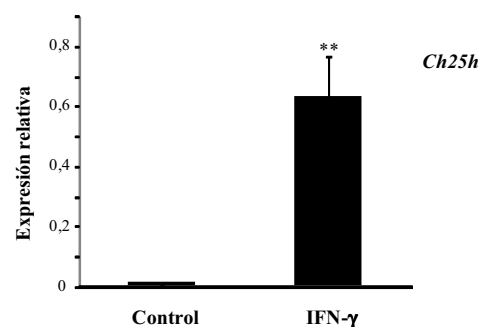


Figura 27.- La activación por IFN- γ de los macrófagos induce la expresión de la enzima colesterol-25-hidroxilasa. Macrófagos derivados de médula ósea fueron mantenidos en DMEM suplementado con 1% FCS inactivado por calor 18h antes de estimular con IFN- γ (5ng/ml) durante 6h. Se extrajo el ARN total y la expresión génica fue evaluada mediante PCR a tiempo real y normalizada por los niveles de expresión de L14. El gráfico muestra el promedio \pm SEM de

cinco experimentos independientes. El análisis de la significatividad estadística se llevó a cabo mediante el test T-Student. ** $p < 0,01$ respecto a las células control.

Los macrófagos en respuesta a la activación por LPS inducen la expresión de la enzima colesterol-25-hidroxilasa (Ch25h) (Diczfalusy et al., 2009). Quisimos comprobar si sucedía lo mismo tras la activación por IFN- γ . Para ello, analizamos la expresión de Ch25h en macrófagos derivados de médula ósea tras un estímulo con IFN- γ (5ng/ml) durante 6 horas. Los resultados muestran un aumento de la expresión de la Ch25h (Figura 27). La inducción de esta enzima sugiere que el propio IFN- γ activa un mecanismo para la producción del agonista endógeno de LXR 25-hidroxicolesterol y promueve así un freno para la activación de los macrófagos por IFN- γ .

Con la finalidad de evaluar la contribución específica de cada una de las isoformas de LXR en el proceso de transrepresión de la señal de IFN- γ llevamos a cabo una primera aproximación a través de ensayos de transfección. Utilizamos la línea celular de macrófagos RAW264.7 y un vector con el promotor del gen Nos2 unido al gen reportero de la luciferasa. Las células RAW264.7 fueron cotransfectadas con el promotor de Nos2, con un plásmido de expresión de LXR α , LXR β o el plásmido vacío además de con un vector de expresión constitutiva de renilla. Utilizamos plásmidos de expresión de LXR α y LXR β ya que en nuestras condiciones experimentales tienen niveles de expresión muy bajos en los macrófagos RAW264.7 (datos no mostrados). Una vez transfectadas las células se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% FCS durante 2 horas. Transcurridas esas 2 horas, las células fueron pretratadas con el agonista de LXR GW3965 (2 μ M) en DMEM suplementado con 1% FCS durante 18 horas y entonces estimuladas con IFN- γ (5ng/ml) durante 24 horas. La actividad del promotor de Nos2 se determinó mediante el análisis de la actividad luciferasa. Estos resultados fueron normalizados con la actividad de renilla como control de la eficiencia de transfección.

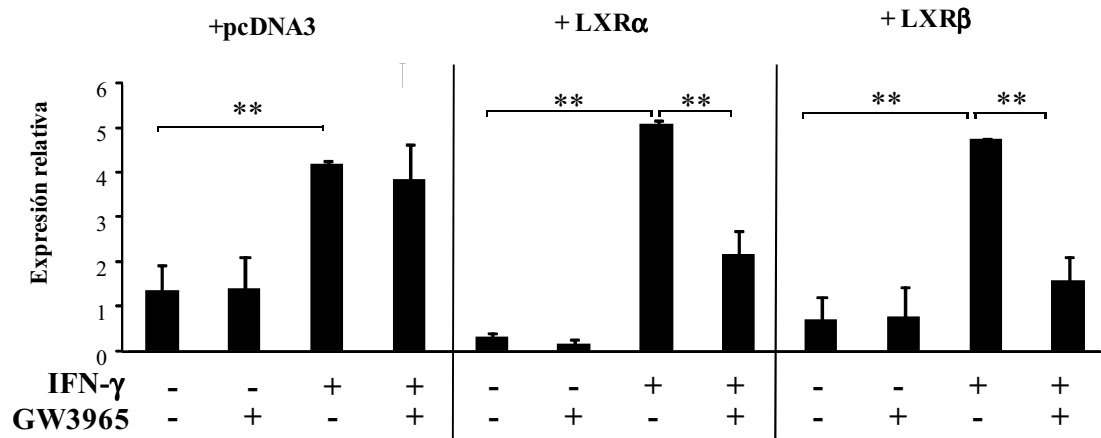


Figura 28.- LXR α y LXR β tienen capacidad para reprimir la inducción del promotor de NOS2 mediada por IFN- γ . Macrófagos RAW264.7 fueron cotransfectados con el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de NOS2 junto a un plásmido de sobreexpresión de LXR α , LXR β o un vector vacío. Todas las células fueron transfectadas también con un plásmido que expresa renilla de forma constitutiva. Las células transfectadas fueron preincubadas con GW3965 (2 μ M) o vehículo durante 18h y entonces estimuladas con IFN- γ (5ng/ml) durante 24h. La actividad del promotor NOS2 inducida por IFN- γ fue normalizada por la actividad del enzima renilla. Los gráficos muestran el promedio de la inducción relativa \pm SEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (mediante el test T-Student).

Podemos observar un aumento de la actividad luciferasa en las células tratadas con IFN- γ (Figura 28). El tratamiento con GW3965 disminuye la actividad luciferasa inducida por IFN- γ sólo en aquellas células transfectadas con LXR α o LXR β . En las células que contenían el plásmido vacío el agonista de LXR no muestra efectos sobre la inducción por IFN- γ , lo que sugiere que los niveles endógenos de LXRs en células RAW264.7 no son suficientes para mediar transrepresión de un plásmido que contiene el promotor de Nos2. Además, nuestros resultados sugieren que ambas isoformas tienen capacidad represora sobre la inducción por IFN- γ del promotor de Nos2.

Otra vía a través de la cual evaluamos la contribución específica de cada una de las isoformas de LXR en el proceso de transrepresión fue utilizando macrófagos deficientes en LXR α o LXR β . Con este fin, macrófagos procedentes de ratones *wild-type* (WT) y deficientes en LXR α (LXR α -/-), LXR β (LXR β -/-) o ambas isoformas (LXR $\alpha\beta$ -/-) fueron tratados con GW3965 (2 μ M) durante 18 horas antes del estímulo con IFN- γ (5ng/ml) durante 6 horas. Para algunos genes se observa una pérdida parcial de la capacidad de transrepresión en los

macrófagos deficientes para LXR α o para LXR β (Figura 29). Estos resultados nos indican que ambas isoformas de LXR tiene capacidad transrepresora. Los efectos de GW3965 desaparecen totalmente en macrófagos deficientes para ambas isoformas (Figura 29), lo cual demuestra que los efectos de GW3965 están mediados por LXR.

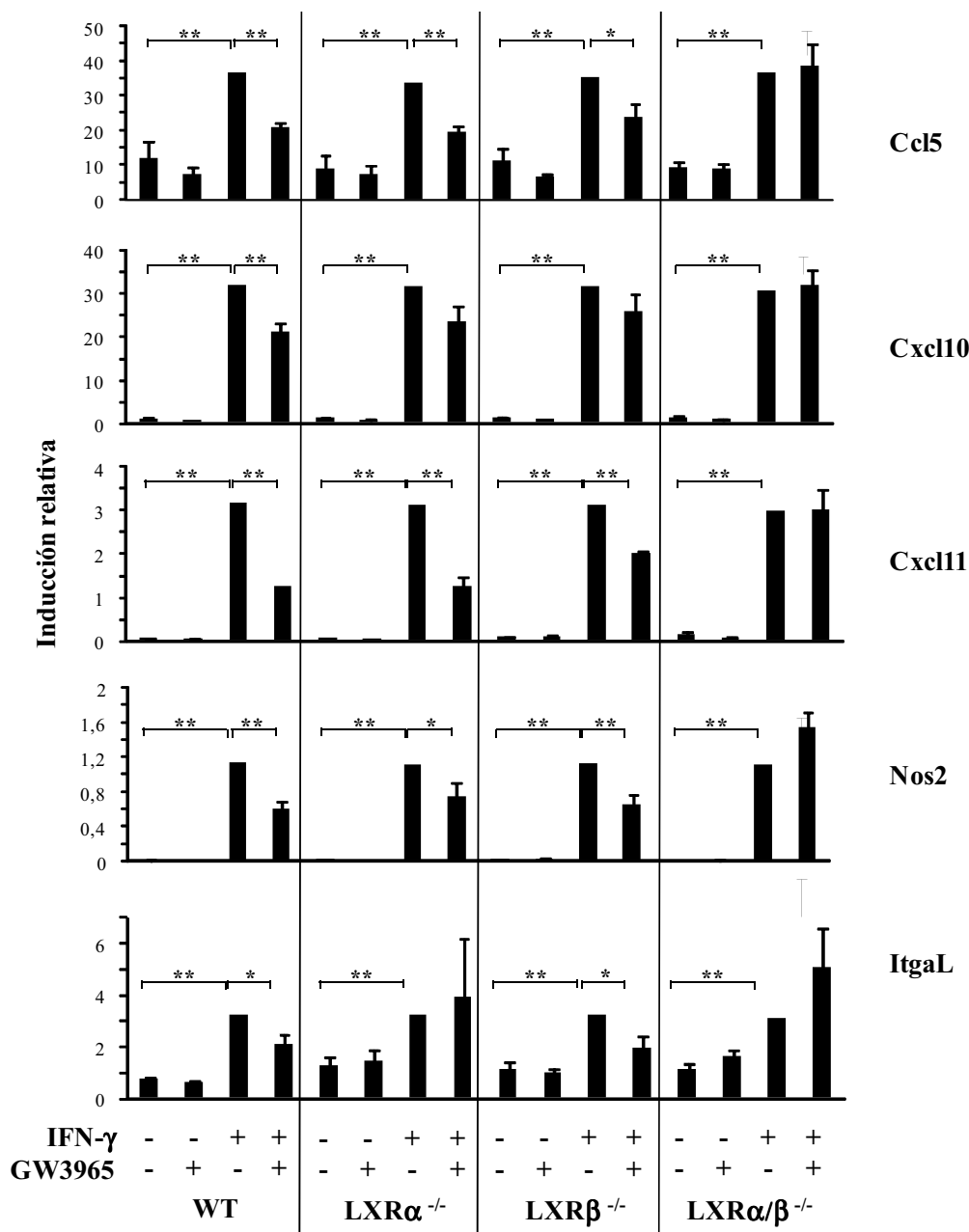


Figura 29.- LXR α y LXR β contribuyen a la represión de la respuesta dependiente de IFN- γ . Los macrófagos fueron obtenidos de ratones WT o deficientes en LXR α (LXR α ^{-/-}), LXR β (LXR β ^{-/-}) o ambas isoformas (LXR α/β ^{-/-}). Las células fueron preincubadas con GW3965 (2 μ M) durante 18h antes de la adición de IFN- γ (5ng/ml) durante 6h. La expresión génica fue evaluada mediante PCR a tiempo real y normalizada por los niveles de expresión de L14. Los gráficos

muestran el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (calculados mediante un test T-Student).

2.2 Estudio del mecanismo molecular a través del cual LXR modula la respuesta a IFN- γ

La señalización por IFN- γ se caracteriza por la activación del factor de transcripción STAT1. Por ello, comprobamos si los agonistas de LXR afectan a la fosforilación de STAT1 en respuesta a IFN- γ . Con este objetivo, macrófagos derivados de médula ósea fueron tratados con GW3965 (2 μ M) seguido de un estímulo con IFN- γ (5ng/ml) a diferentes tiempos. Mediante Western blot analizamos la fosforilación en la serina-727 y la tirosina-701 de STAT1. Los resultados muestran un aumento de la fosforilación en tirosina-701 y serina-727 a partir de los 15 minutos de tratamiento con IFN- γ (Figura 30A). La presencia de GW3965 no disminuye la fosforilación en tirosina-701 o serina-

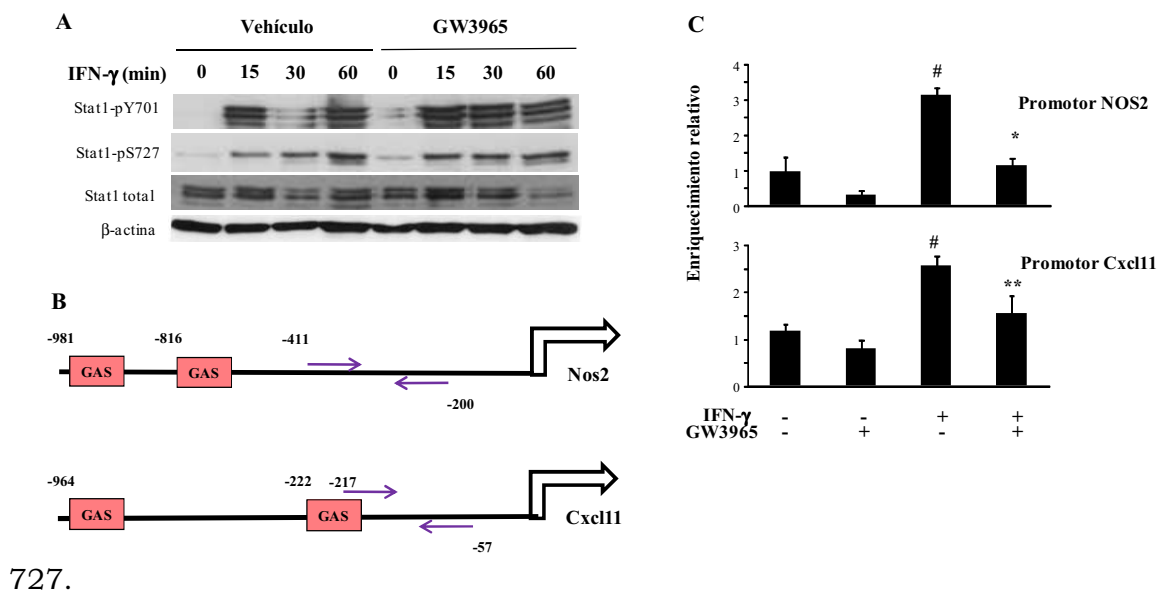


Figura 30.- La activación de LXR inhibe el reclutamiento de STAT1 al promotor de determinados genes diana de IFN- γ sin afectar a la fosforilación. A) Macrófagos derivados de médula ósea fueron incubados con IFN- γ (5ng/ml) durante diferentes periodos de tiempo en presencia de GW3965 (2 μ M) o vehículo (DMSO). La fosforilación de STAT1 en tirosina-701 y serina-727 fue determinada mediante Western blot. Los niveles de STAT1 total y β -actina fueron analizados como control de la carga de proteína. B) Mapa simplificado de las regiones genómicas

de Nos2 y Cxcl11 con los lugares de unión de STAT1 (GAS) y el lugar de unión de los primers (flechas) diseñados. C) Los macrófagos fueron pretratados con GW3965 (2 μ M) o vehículo durante 18h y entonces activados con IFN- γ (5ng/ml) durante 20min. La unión de STAT1 a la región promotora de Nos2 y Cxcl11 fue analizada mediante ChIP. Stat1 total fue inmunoprecipitado utilizando anticuerpos específicos. IgGs de conejo fueron utilizadas como control. La presencia de fragmentos de ADN específicos fue determinada por rt-PCR y normalizada por el ADN de la IgG de cada tratamiento. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM. El análisis de la significatividad estadística se llevó a cabo mediante el test T-Student. #p<0,01 respecto a las células no tratadas; *p<0,05, **p<0,01 respecto a las células tratadas con IFN- γ (en ausencia de agonista de LXR).

A continuación estudiamos el reclutamiento de STAT1 a los promotores de los genes inducidos por IFN- γ tomando como modelo los promotores de Nos2 y Cxcl11 (Figura 30B). Para ello, macrófagos derivados de médula ósea fueron estimulados con GW3965 (2 μ M) durante 18 horas antes del tratamiento con IFN- γ (5ng/ml) durante 20 minutos. A través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina observamos un aumento del reclutamiento de STAT1 en el promotor de los genes Cxcl11 y Nos2 tras el estímulo con IFN- γ . La presencia de GW3965 disminuye el reclutamiento de STAT1 al promotor de estos genes (Figura 30C).

El conjunto de resultados sugiere que LXR reprime la inducción de genes por IFN- γ impidiendo el reclutamiento de STAT1 a determinados promotores sin afectar a la fosforilación de este factor de transcripción.

2.3 Efectos de los ligandos de LXR sobre la activación por IFN- γ de microglía y sobre un modelo *in vivo* de neuroinflamación por IFN- γ .

La producción de IFN- γ contribuye al inicio y amplificación de la respuesta inmunológica local dando lugar potencialmente a neurodegeneración en el sistema nervioso central (Mangano et al., 2011; Mount et al., 2007; Chakrabarty et al., 2011). Por ello, nuestro siguiente propósito fue confirmar la capacidad transrepresora de LXR sobre IFN- γ en las células de microglía, que son macrófagos residentes en el sistema nervioso central. Así, células de microglía primaria obtenidas a partir de la corteza cerebral de ratones neonatos fueron pretratadas durante 18 horas con el agonista GW3965 (2 μ M)

seguido de un estímulo con IFN- γ (5ng/ml) durante 6 horas. La expresión de los diferentes genes se determinó a través de PCR a tiempo real. Observamos que el agonista de LXR es capaz de transreprimir la inducción por IFN- γ de genes inflamatorios como Ccl5, Cxcl10, Cxcl11, Nos2, Ptgs2 y Ccr5 en este tipo celular (Figura 31).

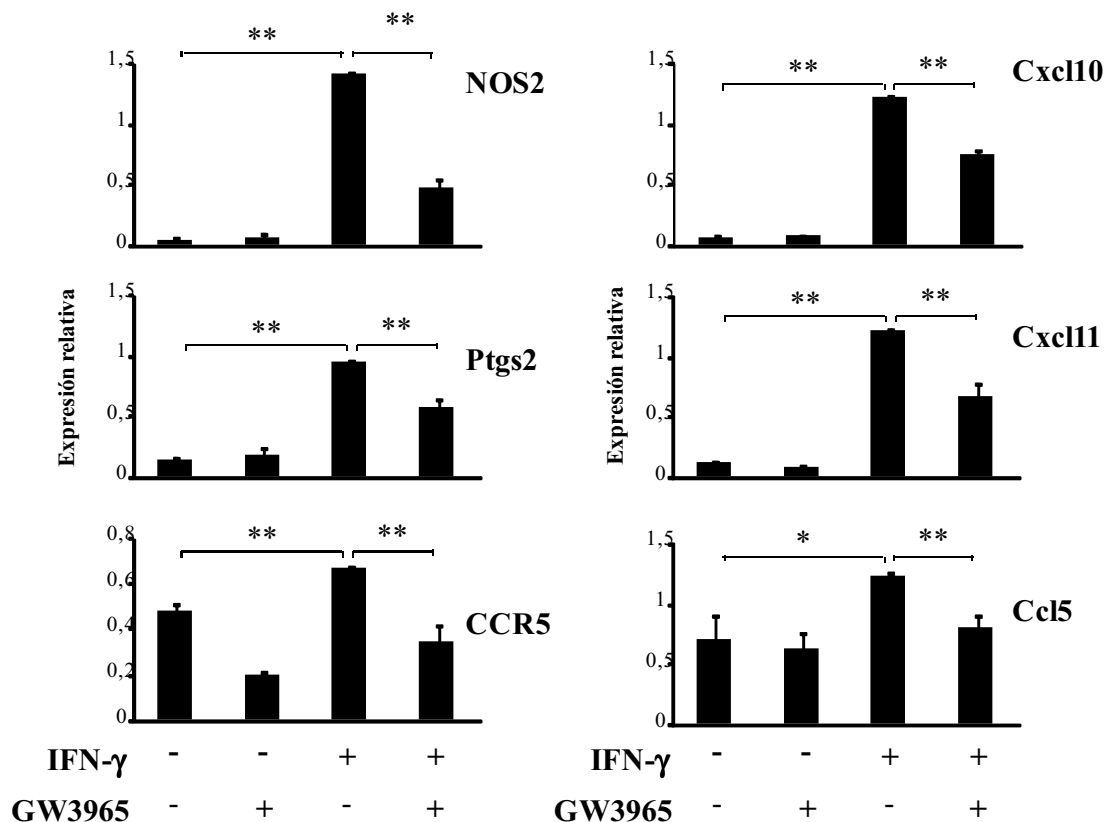


Figura 31.- GW3965 reprime la expresión de genes inducidos por IFN- γ en la microglía. Células de microglía primaria fueron preincubadas con GW3965 (2 μ M) durante 18h y entonces estimuladas con IFN- γ (5ng/ml) durante 6h. La expresión génica fue evaluada mediante PCR a tiempo real y normalizada por los niveles de expresión de L14. Los gráficos muestran el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes. *p<0,05, **p<0,01 (calculados mediante un test T-Student).

Dado que LXR ejerce efectos inhibitorios sobre la microglía activada por IFN- γ quisimos evaluar si la activación de LXR ejercía efectos anti-inflamatorios en un modelo *in vivo* de neuroinflamación inducida por IFN- γ . La inducción de la expresión de genes asociados a inflamación se llevó a cabo a través de la inyección de IFN- γ en el ventrículo central (o tercer ventrículo) del cerebro de ratones C57BL/6 siguiendo como modelo el trabajo descrito por Kong et al.,

(2000). Los ratones fueron inyectados intraventricularmente con 20ng de IFN- γ (PBS en los animales control) en las coordenadas relativas a bregma AP, -0.3 mm; L, 0.0 mm y 3.0 mm. La activación de LXR se llevó a cabo a través de tres inyecciones intraperitoneales (i.p.) de T1317 (10mg/kg) a 2 días, 1 día y 4 horas previas a la inyección intraventricular de IFN- γ . Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la inyección por IFN- γ y se extrajo el cerebro. Se llevó a cabo una extracción de mRNA de los cerebros y los niveles de expresión de diversos genes se determinaron mediante PCR a tiempo real.

Los resultados obtenidos muestran efectos represores del tratamiento con T1317 sobre genes inducidos por IFN- γ como Ccl2, Cxcl10 y Ccl5 (Figura 32). También observamos que la expresión de otros genes proinflamatorios como ItgaL y Ccl3 se encuentra reprimida por la activación de LXR aunque la inducción por IFN- γ no llega a ser significativa.

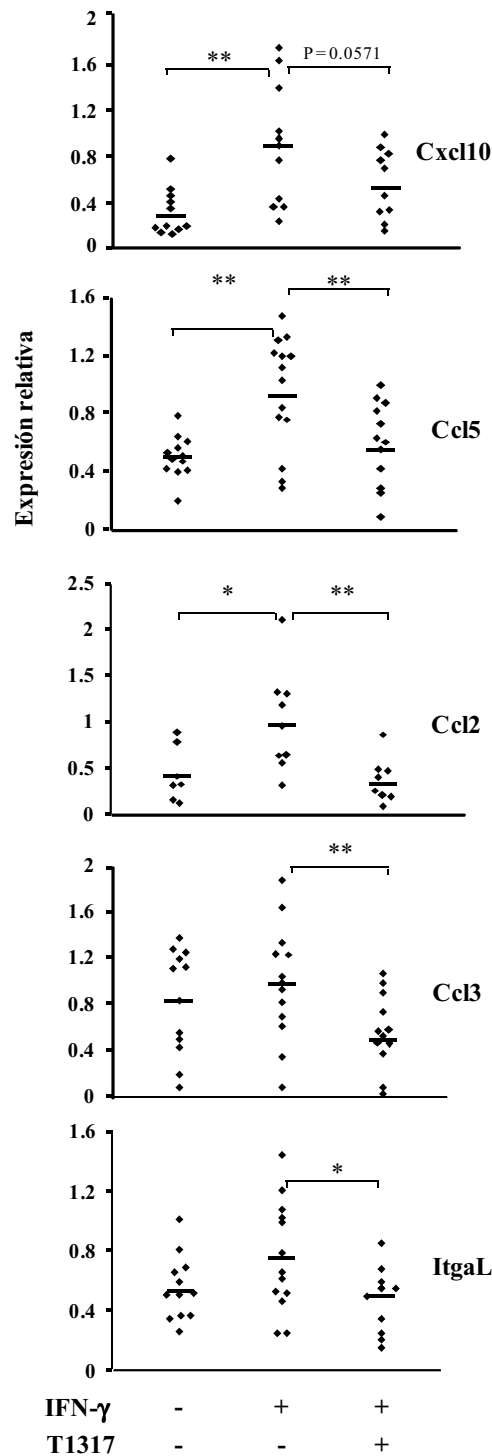


Figura 32.- TO901317 media transrepresión en un modelo *in vivo* de neuroinflamación inducida por IFN- γ . La inflamación del sistema nervioso central fue inducida por una inyección de IFN- γ en el tercer ventrículo del cerebro. Los ratones control fueron inyectados con vehículo (PBS). La activación de LXR fue inducida mediante la inyección i.p. de T1317 (10mg/kg) a 2 días, 1 día y 4h previas a la inyección intracerebroventricular de IFN- γ (20ng/animal). Los animales control recibieron inyecciones i.p. de vehículo (DMSO en PBS). La expresión génica fue evaluada mediante PCR a tiempo real y normalizada por los niveles de expresión de L14. Se muestran los niveles de expresión relativa (diamantes) de cada animal. El valor promedio de cada grupo está representado por barras horizontales. Cada grupo contiene al menos 7

animales. El test U de Wilcoxon/Mann-Whitney fue utilizado para determinar la significatividad estadística. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.4 Efectos de los ligandos de LXR sobre cultivos neuronales.

Los procesos inflamatorios en el sistema nervioso central en algunos casos se asocian a procesos de muerte neuronal. Hemos visto que LXR ejerce efectos antiinflamatorios pero también queríamos evaluar posibles efectos antiapoptóticos. Basándonos en el hecho de que LXR induce la expresión de genes con efectos antiapoptóticos (Valledor et al., 2004) decidimos evaluar el efecto de LXR sobre la muerte de neuronas corticales. Para ello se llevó a cabo un cultivo primario de neuronas corticales a partir de embriones E-17. La muerte neuronal se indujo mediante dos vías ácido glutámico y estaurosporina.

El ácido glutámico es un neurotransmisor excitatorio agonista de los receptores glutamato (metabotropico, kainato, NMDA y AMPA). Una excesiva activación de los receptores lleva a la muerte neuronal por un fenómeno que se conoce como excitotoxicidad (Ankarcrona et al., 1995). En nuestros ensayos las neuronas corticales fueron pretratadas durante 18 horas con los agonistas de LXR (T1317, GW3965; $1\mu\text{M}$) y/o el agonista de RXR (9cRA; $1\mu\text{M}$) antes del tratamiento con ácido glutámico ($100\mu\text{M}$). La muerte neuronal provocada por el ácido glutámico conlleva una primera fase en la que parte de las células mueren por necrosis, aquellas que sobreviven a esta fase necrótica temprana mueren por apoptosis (Ankarcrona et al., 1995). Por ello, tras 2 horas de tratamiento con ácido glutámico retiramos el medio para eliminar el ácido glutámico y las neuronas necróticas para evitar que interfieran en el análisis final. El análisis de la muerte neuronal se llevó a cabo 24 horas después del inicio del estímulo con ácido glutámico (Figura 33A).

La estaurosporina es un inhibidor de proteínas quinasas de amplio espectro habitualmente utilizado como inductor de apoptosis en diversos tipos celulares (Belmokhtar et al., 2001; Xue et al., 2003; D'Alimonte et al., 2007; Simenc and Lipnik-Štangelj, 2012). En nuestro caso, tras tratar a las neuronas durante 18 horas con los agonistas de LXR y/o 9cRA llevamos a cabo un tratamiento con estaurosporina ($1\mu\text{M}$) durante 24 horas (Figura 33B).

La medición de la muerte celular se llevó a cabo mediante el análisis de contenido celular de ADN por citometría de flujo. Las células fueron teñidas con yoduro de propidio y se determinó el porcentaje de células con contenido de ADN subG₀/G₁ como indicador de muerte celular. Los resultados, en ambos casos, muestran un aumento del porcentaje de células en fase subG₀/G₁ en presencia de ácido glutámico o estaurosporina, respectivamente. Sin embargo, no observamos un aumento de la supervivencia de las células en presencia de agonistas de LXR y/o RXR (Figura 33).

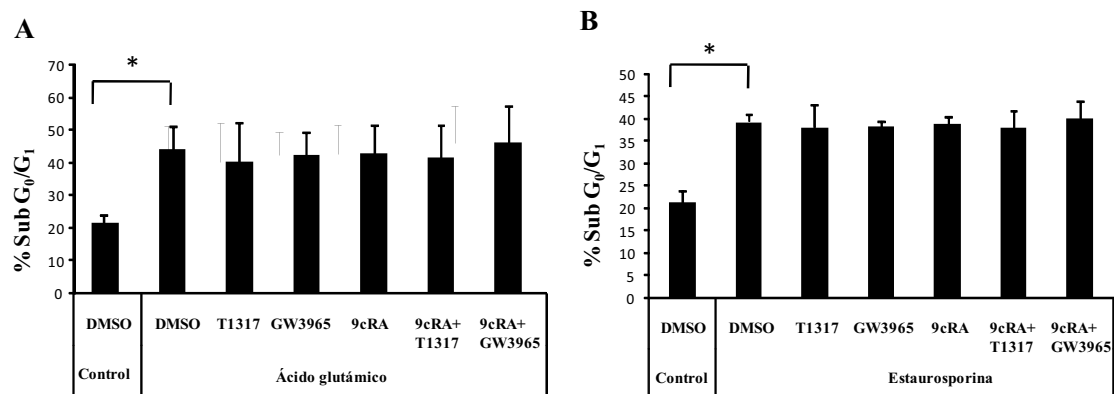


Figura 33.- La activación de LXR no disminuye la muerte neuronal frente a ácido glutámico o estaurosporina. Neuronas corticales fueron pretratadas con T1317 (1μM), GW3965 (1μM) o vehículo (DMSO) en combinación o no con 9cRA (1μM) durante 18h antes de inducir la muerte neuronal. En A la muerte fue inducida mediante un tratamiento con ácido glutámico (100μM) durante 2h en presencia o ausencia de los ligandos. A continuación el ácido glutámico fue retirado y la muerte celular se analizó 22h más tarde. En B la muerte celular fue inducida mediante el tratamiento con Estaurosporina (1μM) durante 24h. A continuación se midió el estado de fragmentación de ADN, como indicador de muerte celular. En A y B el porcentaje de células con contenido de ADN sub-G₀/G₁ fue determinado mediante citometría de flujo. Los gráficos muestran el porcentaje promedio ± SD de dos experimentos independientes llevados a cabo en duplicado. *p<0,01(calculados mediante un test T-Student).

Tras no observar efectos antiapoptóticos directos de los agonistas de LXR sobre las neuronas corticales quisimos comprobar si era debido a que en este tipo celular LXR no induce la expresión de los genes antiapoptóticos AIM, Bcl211 y NAIP previamente identificados en macrófagos (Valledor et al., 2004). Para ello, las neuronas fueron tratadas durante 24 horas con los agonistas de LXR T1317 (1μM) o GW3965 (1μM) y/o con el agonista de RXR 9cRA (1μM). Los resultados mostraron que la expresión de los genes antiapoptóticos AIM,

Bcl211 y NAIP no se ve aumentada por el tratamiento con los agonistas de LXR y/o RXR (Figura 34). En cambio, observamos que los agonistas de LXR inducen la expresión del transportador de colesterol ABCA1 y que en combinación con 9cRA se observa un efecto sinérgico en esta inducción (Figura 34), lo cual confirma que tanto LXR como RXR son funcionales en este tipo celular.

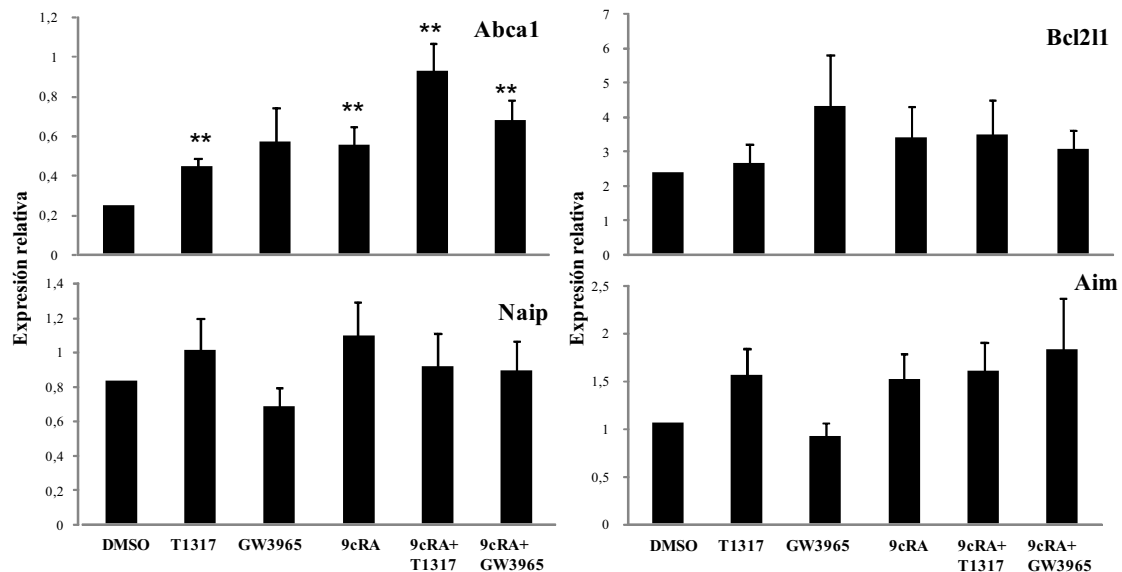


Figura 34.- La activación de LXR no induce significativamente la expresión transcripcional de genes antiapoptóticos en neuronas corticales. Neuronas corticales fueron tratadas con T1317 (1 μ M), GW3965 (1 μ M) o vehículo (DMSO) en combinación o no con 9cRA (1 μ M) durante 24h. La expresión génica fue evaluada mediante PCR a tiempo real y normalizada por los niveles de expresión de L14. Los gráficos muestran el promedio \pm SEM de siete experimentos independientes. * p <0,05, ** p <0,01 (calculados mediante un test T-Student).

Hemos visto que LXR no ejerce efectos directos sobre la supervivencia neuronal pero no podemos descartar que ejerza efectos indirectos como consecuencia de la activación de las células de la microglía. Con la finalidad de comprobar esta posibilidad llevamos a cabo una primera aproximación mediante el uso de sobrenadante de microglía tratada con agonistas de LXR. Para ello tratamos a las células de la línea de microglía BV-2 con agonistas de LXR y/o RXR durante 24 horas. El sobrenadante de estas células fue utilizado para tratar a las neuronas corticales durante la inducción de muerte neuronal con ácido glutámico. El ácido glutámico fue retirado a las 2 horas y el análisis del porcentaje de células SubG₀/G₁ se llevó a cabo 22 horas después. Los resultados muestran que el tratamiento con el sobrenadante de las células BV-2 no estimuladas con agonistas de LXR tiene un efecto protector sobre las neuronas por sí mismo, el cual no se ve aumentado por el tratamiento de las células de microglía con agonistas de LXR y/o RXR (Figura 35).

En conclusión, observamos que LXR ejerce efectos antiinflamatorios en el sistema nervioso central pero no ejerce efectos directos sobre la supervivencia de las neuronas corticales.

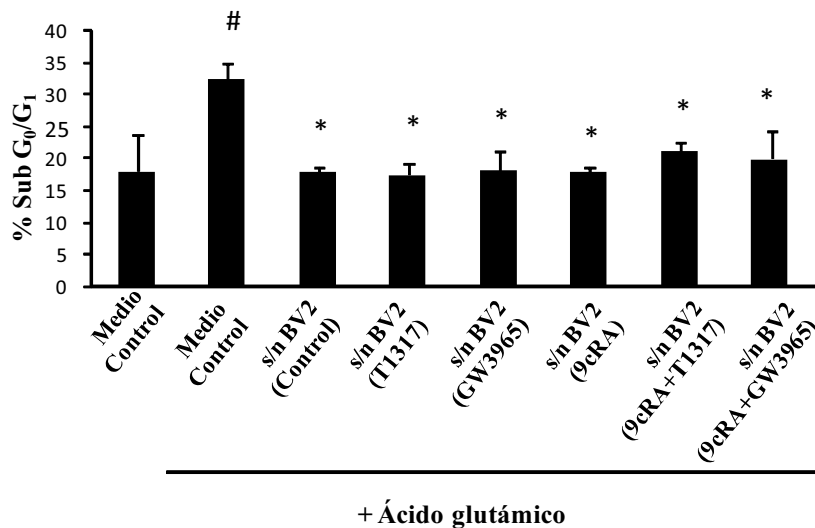


Figura 35.- El sobrenadante de la línea de microglía BV-2 protege a las neuronas corticales frente a la muerte por excitotoxicidad.

Células de la línea de microglía BV-2 fueron tratadas durante 24h con los agonistas de LXR T1317 (1 μ M) o GW3965 (1 μ M) o vehículo en presencia o ausencia del ligando de RXR 9cRA (1 μ M). El sobrenadante de estas células (s/n BV-2) con los diferentes tratamientos se añadió a las neuronas 18 horas antes del tratamiento con ácido glutámico. El ácido glutámico fue retirado a las 2 horas y las neuronas se incubaron de nuevo con el sobrenadante correspondiente durante 22 horas antes del análisis de supervivencia. Las células control fueron incubadas con Neurobasal Medium (Medio control) a lo largo de todo el experimento. La inducción de muerte por excitotoxicidad fue llevada a cabo mediante un tratamiento con ácido Glutámico (100 μ M) durante 2h y entonces incubadas con el medio o sobrenadante correspondiente durante 22h. El análisis del porcentaje de células muertas con contenido de ADN sub-G₀/G₁ fue determinado mediante citometría de flujo. Los gráficos muestran el porcentaje promedio \pm SD de dos experimentos independientes llevados a cabo en duplicado. #p<0,01 respecto a las células con medio control en ausencia de ácido glutámico. *p<0,01 respecto a las células con medio control tratadas con ácido glutámico (La significatividad fue calculada mediante el test T-Student).

2.5 Efectos de IFN- γ sobre la actividad de LXR

Tras observar que LXR tiene capacidad para transreprimir la respuesta a IFN- γ también decidimos estudiar posibles efectos de IFN- γ sobre la actividad de

LXR. Con este objetivo, macrófagos derivados de médula fueron pretratados durante 18 horas con IFN- γ (5ng/ml) seguido de un tratamiento con T1317 (1 μ M), GW3965 (1 μ M) o vehículo durante 24 horas. Los resultados muestran que IFN- γ reprime la inducción mediada por los agonistas de LXR de los genes

Abca1, Srebp1c y AIM. En cambio, la inducción de Abcg1, Idol y Mertk no se ve disminuida por la presencia de IFN- γ (Figura 36). Mertk, en particular, parece estar inducida por IFN- γ . El hecho de que IFN- γ no inhiba todos los genes inducidos por LXR sugiere que la interferencia de IFN- γ probablemente es específica de gen y no implica un efecto sobre la actividad general de LXR.

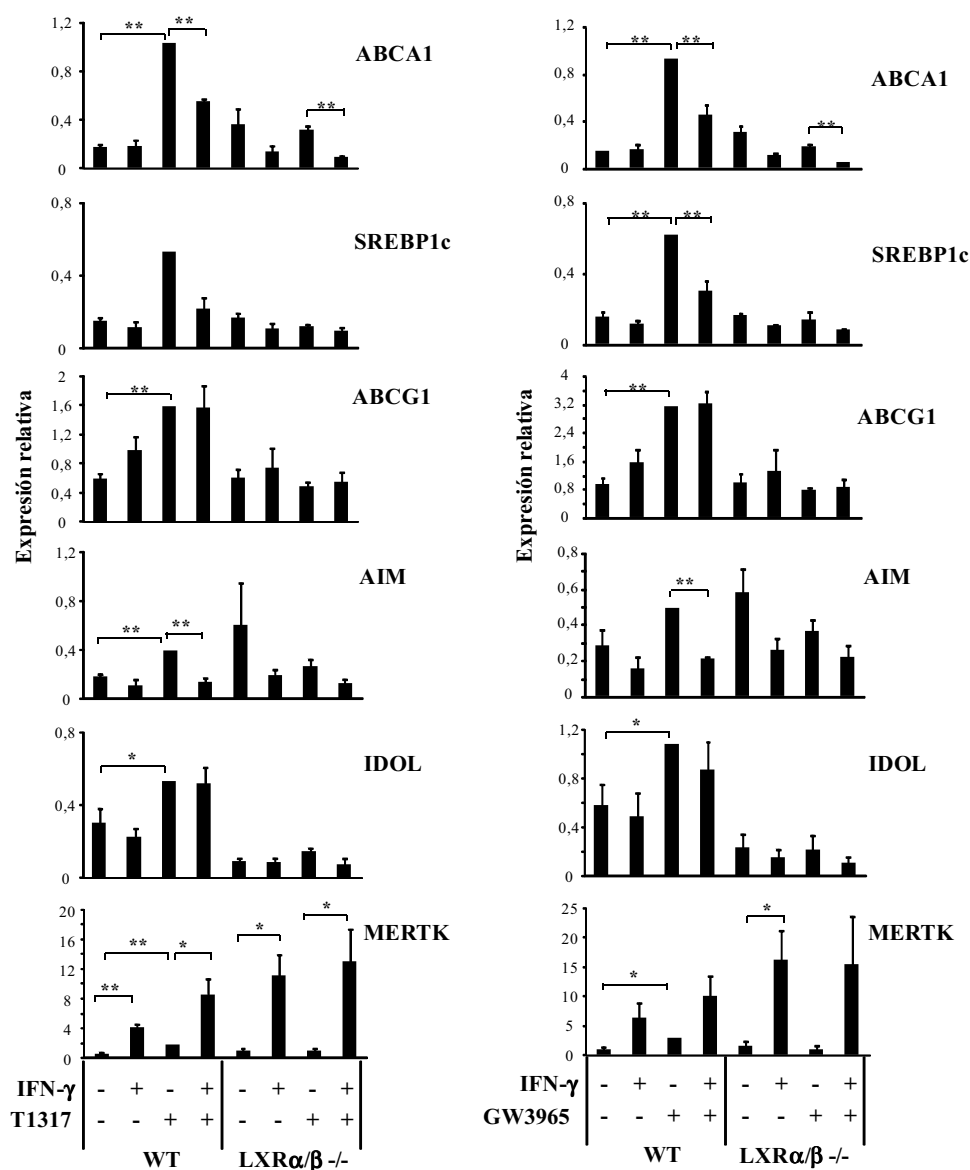


Figura 36.- IFN- γ reprime selectivamente la expresión de genes diana de LXR. Macrófagos procedentes de ratones WT y deficientes en LXR (LXR α/β ^{-/-}) fueron pretratados durante 18h

con IFN- γ (5ng/ml) antes del estímulo con T1317 (1 μ M) durante 24h. Los niveles de ARNm fueron determinados mediante PCR a tiempo real. Los datos representan valores promedio de inducción relativa \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student. * p <0,05, ** p <0,01.

Para evaluar la implicación de STAT1 en los efectos represores de IFN- γ sobre genes inducidos por LXR utilizamos macrófagos procedentes de ratones WT o deficientes en STAT1 (Stat1 $^{-/-}$). Observamos que la inhibición de IFN- γ sobre Abca1 y Srebp1c se pierde en los macrófagos Stat1 $^{-/-}$ (Figura 37), lo cual indica que IFN- γ reprime la inducción de Abca1 y Srebp1c por LXR de manera dependiente de STAT1. Además, en ausencia de LXRs funcionales IFN- γ es aún capaz de reprimir la expresión de Abca1 (Figura 37), lo cual sugiere que STAT1 interfiere en los mecanismos de regulación de Abca1 tanto dependientes como independientes de LXR.

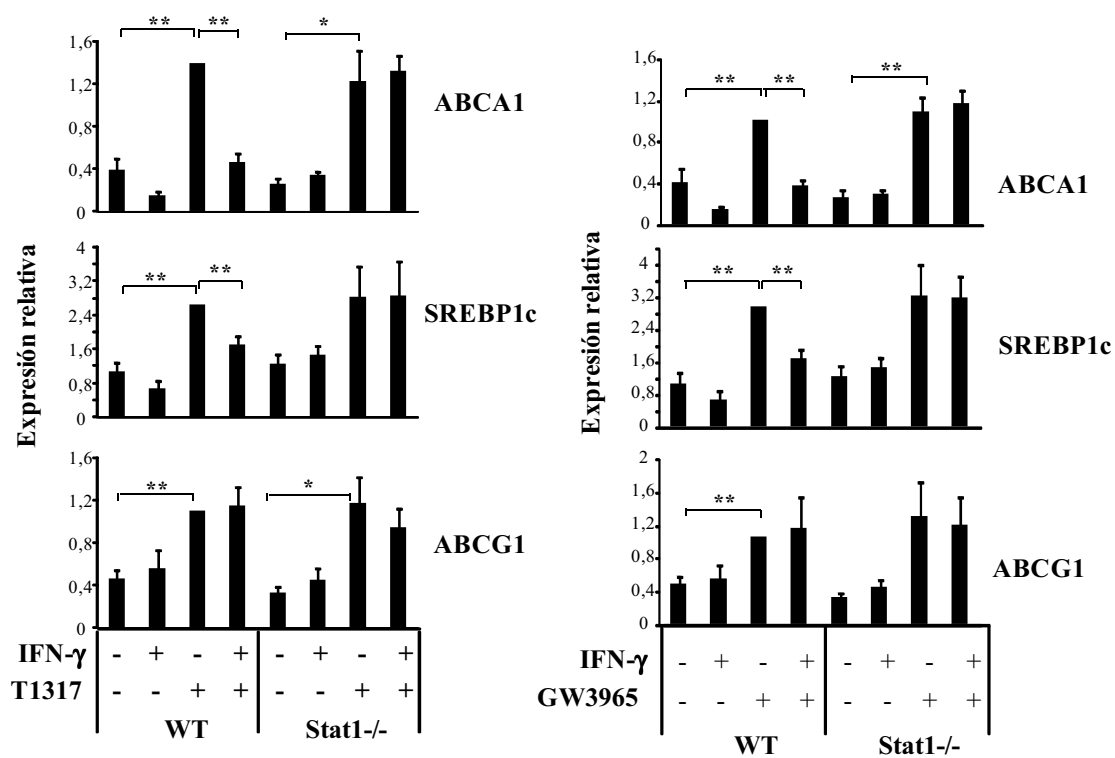


Figura 37.- IFN- γ reprime selectivamente la expresión de genes diana de LXR de forma STAT1 dependiente. Macrófagos procedentes de ratones WT y deficientes en Stat1 (Stat1 $^{-/-}$) fueron pretratados durante 18h con IFN- γ (5ng/ml) antes del estímulo con T1317 (1 μ M) durante 24h. Los niveles de ARNm fueron determinados mediante PCR a tiempo real. Los datos representan valores promedio de inducción relativa \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student. * p <0,05, ** p <0,01.

Con el objetivo de comprobar si la disminución en la expresión a nivel de ARNm de ABCA1 se correspondía con una disminución a nivel de proteína llevamos a cabo un ensayo de Western blot. Para ello, los macrófagos fueron preincubados durante 18 horas en presencia de IFN- γ y tratados con GW3965 durante 24 horas antes de llevar a cabo la extracción de proteína. El análisis de la expresión a nivel de proteína de ABCA1 mostró un aumento tras el estímulo con el agonista de LXR GW3965 que se veía disminuido en presencia de IFN- γ (Figura 38A).

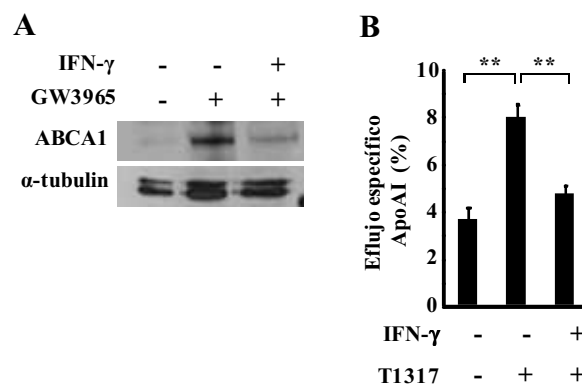


Figura 38.- IFN- γ regula negativamente la expresión de a nivel de proteína inducida por GW3965 y reprime el eflujo de colesterol específico de ApoAI. A) Macrófagos derivados de médula ósea fueron preincubados con IFN- γ (5ng/ml) durante 18h y entonces estimulados con GW3965 (2 μ M) durante 24h. Se extrajo la proteína total y la expresión de ABCA1 se analizó mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. La expresión de α -tubulina se utilizó como control de la carga de proteína. B) Los macrófagos fueron cargados con acLDL-colesterol- H^3 en presencia o ausencia de IFN- γ (5ng/ml) durante 24h. Después del equilibrio, las células fueron mantenidas durante 24h en DMEM suplementado con IFN- γ y/o T1317 (1 μ M). El eflujo celular de colesterol fue inducido por la adición de 20 μ g/ml de ApoAI (libre de lípidos) durante las últimas 4h de ensayo. Se contabilizó la radioactividad presente en el medio y en la fracción celular. El porcentaje de eflujo de colesterol fue calculado como 100x (cpm en el medio)/(cpm en el medio + cpm en la fracción celular). Cada punto fue llevado a cabo por triplicado y los resultados se expresan como el promedio \pm SD. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student. *p<0,01.

ABCA1 es un transportador implicado en el transporte reverso de colesterol que participa en la transferencia de colesterol a apolipoproteínas aceptoras pobres en lípidos como ApoAI (Oram and Vaughan, 2000). La mutación de ABCA1 en humanos da lugar a la enfermedad de Tangier, un trastorno que se caracteriza por una ausencia de HDL en plasma y por la acumulación de colesterol en los macrófagos residentes en los tejidos (Rust et al., 1999; Lawn

et al., 1999; Brooks-Wilson et al., 1999; Bodzioch et al., 1999). Con el objetivo de evaluar si la represión mediada por IFN- γ sobre la expresión a nivel transcripcional de ABCA1 correlaciona con una disminución del eflujo de colesterol en presencia del receptor ApoAI llevamos a cabo un ensayo *in vitro* de transporte de colesterol. Para ello, macrófagos derivados de médula ósea fueron cargados con acLDL-colesterol- H^3 en presencia o ausencia de IFN- γ (5ng/ml) durante 24 horas. Después de un equilibrado, las células fueron mantenidas durante 24 horas en DMEM suplementado con IFN- γ (5ng/ml) y/o T1317 (1 μ M). El eflujo de colesterol fue inducido por la adición de 20 μ g/ml de ApoAI (libre de lípidos) durante las últimas 4 horas del ensayo. Los resultados muestran que IFN- γ reduce el porcentaje de eflujo de colesterol en presencia de ApoAI, lo que correlaciona con la inhibición de la expresión de ABCA1 (Figura 38B).

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo a través del cual IFN- γ interfiere sobre la actividad de LXR quisimos analizar los efectos de IFN- γ sobre la expresión a nivel transcripcional de las isoformas de LXR y RXR. Para ello los macrófagos fueron tratados durante 18 horas con IFN- γ (5ng/ml) y, a continuación, fueron añadidos los agonistas de LXR durante 24 horas. Observamos que IFN- γ inhibe selectivamente la expresión de RXR α , pero no afecta a la expresión de LXR α , LXR β y RXR β (Figura 39A). Por otro lado, analizamos si IFN- γ afecta la actividad del promotor de Abca1 a través de ensayos de transfección. Células RAW264.7 fueron cotransfectadas con un plásmido con el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de Abca1 murino y con plásmidos de expresión para LXR β y RXR α . Las células control fueron transfectadas con el vector del promotor de Abca1 unido a luciferasa en presencia del plásmido pcDNA3 vacío. Todas las células fueron transfectadas con un vector de expresión de β -galactosidasa bajo el control del promotor de β -actina. Una vez transfectadas las células fueron pre-tratadas durante 18 horas con IFN- γ (5ng/ml) y entonces, estimuladas con los agonistas de LXR durante 24 horas. Los niveles de actividad luciferasa fueron normalizados respecto a la actividad β -galactosidasa. Los resultados mostraron que IFN- γ inhibió la actividad tanto basal como inducida por LXR del promotor de Abca1 (Figura 39C), lo cual indica que IFN- γ es capaz de reprimir la actividad transcripcional de Abca1.

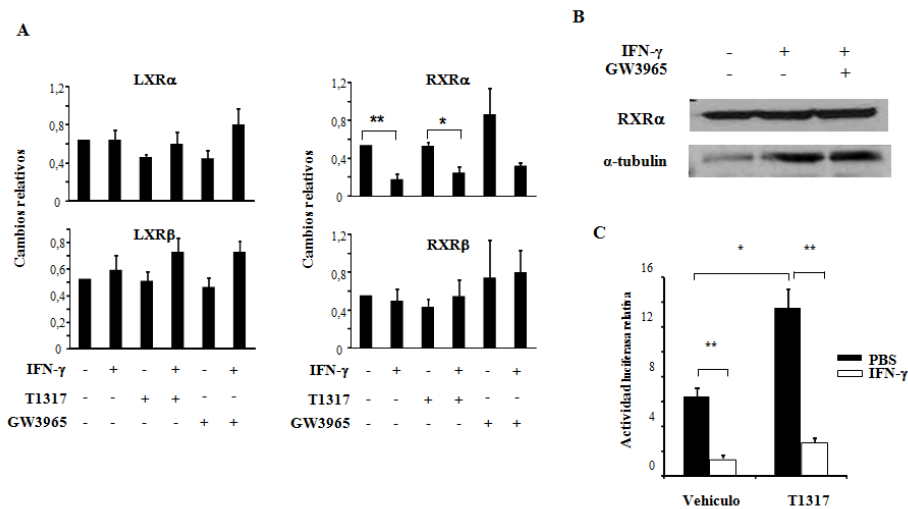


Figura 39.- IFN- γ inhibe la expresión de RXR α y la actividad del promotor de Abca1. A) La expresión a nivel de ARNm de las isoformas de LXR y RXR fue evaluada mediante PCR a tiempo real utilizando muestras de macrófagos tratados con IFN- γ durante 18h y/o agonistas de LXR (1 μ M) durante 24h. En los gráficos se muestra el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test T-Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. B) Macrófagos derivados de médula ósea fueron preincubados con IFN- γ (5ng/ml) durante 18h y entonces estimulados con GW3965 (2 μ M) durante 24h. Se extrajo la proteína total y la expresión de RXR α se analizó mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. La expresión de α -tubulina se utilizó como control de la carga de proteína. C) Macrófagos RAW264.7 fueron cotransfectados con el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de Abca1 junto los plásmidos de sobreexpresión de LXR β y RXR α o un vector vacío. Todas las células fueron transfectadas también con un plásmido que expresa β -galactosidasa bajo el control del promotor de β -actina. Las células transfectadas fueron preincubadas con IFN- γ (5ng/ml) o PBS durante 18h y entonces estimuladas con T1317 (1 μ M) durante 24h. Los niveles de actividad luciferasa fueron normalizados por los de actividad β -galactosidasa. El gráfico muestra el promedio de la actividad luciferasa relativa \pm SD de triplicados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (mediante el test T-Student).

Seguidamente evaluamos la unión de LXR y RXR α a las regiones promotoras de Abca1, Abcg1 y Srebp1c para conocer si esta unión se mostraba afectada por la presencia de IFN- γ . Con este objetivo, macrófagos derivados de médula ósea fueron tratados durante 18 horas con IFN- γ (5ng/ml) seguido de un estímulo con GW3965 (1 μ M) durante 90 minutos. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se determinó la unión de LXR y RXR α a las diferentes regiones promotoras. Los resultados muestran que la unión de LXR

y RXR α al promotor de los genes *Abca1*, *Abcg1* y *Srebp1c* no disminuye en presencia de IFN- γ (Figura 40B y C). Estas observaciones sugieren que IFN- γ reprime la inducción de *Abca1* y *Srebp1c* sin afectar directamente a la capacidad de LXR y RXR α de unirse a sus promotores.

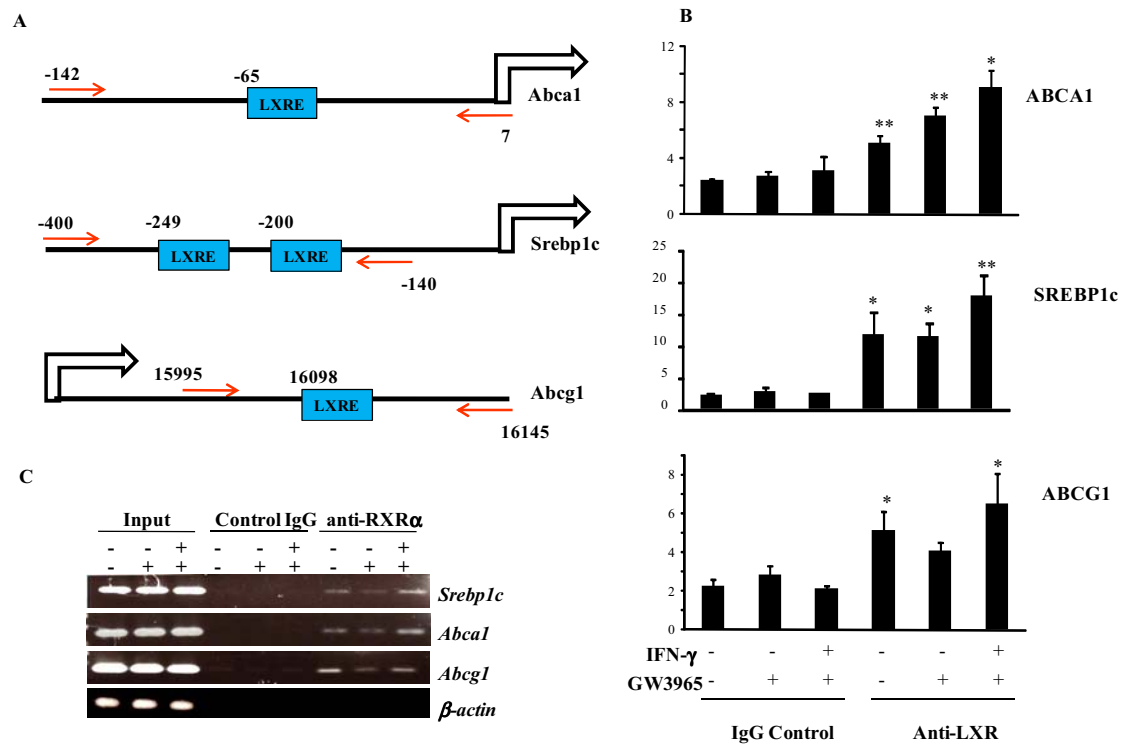


Figura 40.- IFN- γ no inhibe en la unión de LXR y RXR α al promotor de sus genes diana. A) Mapa simplificado de las regiones genómicas de *Abca1*, *Srebp1c* y *Abcg1* con los lugares de unión de LXR (LXRE) y el lugar de unión de los primers (flechas) diseñados. B y C) Los macrófagos fueron pretratados con IFN- γ (5ng/ml) durante 18h y entonces estimulados con GW3965 (1 μ M) durante 90 min. B) La unión de LXR a la región promotora de los genes seleccionados fue analizada mediante ensayos de ChIP utilizando anticuerpos para inmunoprecipitar LXR α / β . IgGs inespecíficas fueron utilizadas como control. Los niveles de ADN de las muestras inmunoprecipitadas y de sus respectivos *Inputs* fueron analizados mediante PCR a tiempo real. Se muestra el promedio de tres experimentos \pm SEM. El análisis de la significatividad estadística se llevó a cabo mediante el test T-Student. * p <0,05, ** p <0,01 respecto a la IgG control correspondiente a cada tratamiento. C) La unión de RXR α a la región promotora de los genes seleccionados fue analizada mediante ensayos de ChIP utilizando un anticuerpo de conejo específico. IgGs inespecíficas fueron utilizadas como control. Los niveles de ADN de las muestras inmunoprecipitadas y de sus respectivos *Inputs* fueron analizados mediante PCR a tiempo final.

DISCUSIÓN

A nivel fisiológico, los LXRs tienen un papel importante como integradores de señales metabólicas e inflamatorias (revisado en Zelcer and Tontonoz, 2006). Tras la activación por oxisteroles, los LXRs activan la expresión de genes involucrados en la homeostasis lipídica, el metabolismo de la glucosa, la supervivencia de los macrófagos y la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (revisado en A-González and Castrillo, 2011). A parte de la regulación positiva de la expresión de genes diana, la activación de LXR inhibe la inducción de genes proinflamatorios en respuesta a determinadas señales inflamatorias (revisado en Pascual-García and Valledor, 2012).

Los macrófagos juegan un papel importante tanto en el metabolismo lipídico como en la respuesta inflamatoria. Por ello, la activación de LXR en macrófagos se hace especialmente importante, ya que este receptor nuclear es capaz de regular genes implicados en ambas facetas.

En este trabajo, hemos mostrado que los agonistas de LXR, de manera dosis-dependiente y LXR-específica, son capaces de limitar la expansión de los macrófagos y sus células progenitoras en respuesta a M-CSF. Se ha demostrado que los agonistas de LXR ejercen acciones antiproliferativas en otros sistemas celulares, incluyendo células vasculares del músculo liso (Blaschke et al., 2004), células de cáncer de próstata (Chuu et al., 2007), células de cáncer de mama (Vedin et al., 2009), linfocitos T (Bensinger et al., 2008) y células β de los islotes pancreáticos (Meng et al., 2009). Mientras llevábamos a cabo este trabajo, también se demostraron efectos antiproliferativos de los agonistas de LXR en varias líneas celulares, incluyendo la línea de macrófagos humanos THP-1 (Kim et al., 2010). Nuestros resultados indican que ambas isoformas de LXR, α y β , participan en las acciones antiproliferativas de los agonistas de LXR en macrófagos. En ausencia de ambas isoformas, los macrófagos presentan un aumento de la respuesta proliferativa a M-CSF y se pierde la capacidad inhibitoria de los agonistas sintéticos de LXR. En concordancia con nuestros datos, las células gliales en el cerebro de los ratones deficientes para LXR α/β también presentan un nivel más elevado de proliferación (Wang et al., 2002). Estas observaciones contrastan con el papel específico de LXR β en la inhibición de la expansión de linfocitos T dirigida por mitógenos o antígenos (Bensinger et al., 2008), lo que puede ser consecuencia de que LXR β juega un papel predominante sobre LXR α en los linfocitos T.

Los efectos antiproliferativos de la vía de LXR en macrófagos derivados de médula ósea correlacionan con los efectos inhibitorios de LXR sobre la expresión a nivel de proteína de determinadas ciclinas y CDKs. En particular, hemos observado una expresión proteica reducida de CCND1 y B1 y de CDK2 y 4, aunque no podemos descartar que otras ciclinas y CDKs no comprobadas en este estudio también estén afectadas. La regulación negativa de CCND1, CDK2 y CDK4 correlaciona con el hecho que los macrófagos tratados con agonistas de LXR se acumulan de forma predominante en la fase G₁ del ciclo celular. La activación de LXR sólo afecta a la expresión a nivel de proteína de estas moléculas sin disminuir sus niveles de ARNm, lo cual sugiere que, en contraste con los efectos de los agonistas de LXR sobre la expresión de genes pro-inflamatorios, la inhibición de la expresión de CCND1, CDK2 y CDK4 no está mediada por una transrepresión directa de los genes que codifican para estas proteínas. Curiosamente, la expresión de CCNB1, la cual actúa posteriormente durante el ciclo celular (Bassermann et al., 2005), sí que se ve afectada a ambos niveles, tanto de proteína como de ARNm. Sin embargo, no podemos descartar que las acciones sobre la expresión de CCNB1 sean efectos secundarios resultantes de la progresión anormal a lo largo de la fase S del ciclo celular. La activación de LXR da lugar a cambios en la expresión de ciclina también en otros tipos celulares. Por ejemplo, en células vasculares de la musculatura lisa y en células humanas de cáncer de mama, CCNA y D1 están afectadas (Blaschke et al., 2004; Vedin et al., 2009), mientras que cambios en CCNE1 y E2 han sido descritos en linfocitos T (Bensinger et al., 2008). La razón por la cual existe esta variabilidad en el tipo de ciclinas afectadas por los agonistas de LXR en los diferentes sistemas celulares no ha sido determinada. Pese a estas diferencias, un punto en común es que la mayor parte de los estudios muestran una parada de las células en la fase G₁ del ciclo celular.

Curiosamente, algunas publicaciones sobre los efectos antiproliferativos de LXR también muestran una estabilización del inhibidor de ciclo celular p27KIP1, mediada por la supresión de la expresión de SKP2, una proteína que marca a p27KIP1 para su degradación (Chuu et al., 2007; Fukuchi et al., 2004b). No obstante, nuestros experimentos utilizando células derivadas de ratones deficientes en p27KIP1 no respaldan un papel de esta proteína en la disminución de la proliferación de los macrófagos en respuesta a ligandos de

LXR. De acuerdo con nuestras observaciones, los agonistas de LXR inhiben la proliferación de líneas específicas de cáncer de mama humanas (Vedin et al., 2009) y de linfocitos T estimuladas con IL-2 (Geyeregger et al., 2009) sin alterar los niveles de p27KIP1. Además, muchos de los estudios que muestran efectos de los agonistas de LXR sobre los niveles de proteína de p27KIP1 se basan en experimentos llevados a cabo con dosis altas de estos agonistas (hasta 10 veces superior de las dosis máximas utilizadas en nuestras condiciones experimentales) (Meng et al., 2009; Fukuchi et al., 2004b), y no incluyen demostración de si estos efectos son específicos de LXR o no.

Otro punto fundamental en este contexto es si cambios en la redistribución de colesterol juegan un papel en los efectos antiproliferativos de LXR en macrófagos. Bensinger et al., (2008) mostraron que la proliferación de linfocitos T correlaciona con un aumento de la expresión de la sulfotransferasa SULT2B1, una enzima que transfiere grupos sulfato a oxisteroles, inactivándolos como ligandos de LXR y facilitando su salida de la célula. Como consecuencia, la expresión de los genes diana de LXR *Abca1* y *Abcg1* aparecía disminuida durante la proliferación de linfocitos T. Se ha demostrado que el colesterol es esencial para que se lleve a cabo la mitosis (Fernández et al., 2004). La hipótesis de Bensinger et al., (2008) es que una reducción de la expresión del transportador de colesterol ABCG1 afectaría a la distribución de colesterol intracelular. La disminución de ABCG1 durante la proliferación de linfocitos T representaría una estrategia para los linfocitos T para asegurar una progresión adecuada a lo largo del ciclo celular. Quizás el mismo tipo de hipótesis podría plantearse para ABCA1. Una disminución de la expresión de ABCA1 facilitaría la retención de colesterol en la célula y podría constituir una estrategia de retención de los recursos necesarios para mantener el ciclo celular. De hecho, grupos independientes han demostrado que linfocitos deficientes en ABCG1 (Bensinger et al., 2008; Armstrong et al., 2010) y células humanas de cáncer de próstata con deficiencia en ABCA1 (Fukuchi et al., 2004a) presentan ventajas proliferativas. En nuestros estudios, macrófagos con deficiencia en la expresión de ABCA1 o ABCG1 mostraron mayores niveles de proliferación comparados con las células control, lo que apoya la idea de que un aumento de la disponibilidad intracelular de colesterol favorece las respuestas proliferativas. Sin embargo, la señalización de M-CSF no interfirió de forma negativa con la expresión basal o la inducción por agonistas de LXR

de las dianas de LXR implicadas en el metabolismo lipídico, incluyendo ABCA1 y ABCG1, lo cual sugiere que la proliferación de los macrófagos en respuesta a M-CSF, a diferencia de la expansión de linfocitos T dirigida por mitógenos, no requiere una represión de las vías dependientes de LXR. En apoyo a esta observación, estudios de perfiles de expresión llevados a cabo en macrófagos humanos tratados con M-CSF revelaron un enriquecimiento de la expresión de genes de programas implicados en el metabolismo lipídico (El Chartouni et al., 2010), no lo contrario. Además, en nuestros estudios los efectos antiproliferativos de los agonistas de LXR en la proliferación de los macrófagos no se vieron alterados en macrófagos con una expresión de ABCA1 y ABCG1 reducida. La naturaleza compleja de la homeostasis de colesterol en macrófagos puede ayudar a explicar estas diferencias entre macrófagos y linfocitos T.

Un estudio reciente comparando diferentes líneas celulares propone una correlación estrecha entre la parada de ciclo celular mediada por LXR y la expresión de genes lipogénicos y la acumulación de triacilglicéridos (Kim et al., 2010). En nuestras manos, sin embargo, el uso de siRNA para reprimir la expresión de Srebp-1c no contrarrestó los efectos antiproliferativos de LXR en macrófagos, en línea con los resultados obtenidos en células humanas de cáncer de mama (Vedin et al., 2009).

La proliferación de los macrófagos contribuye a la patogénesis de ciertas enfermedades. Por ejemplo, existen evidencias de proliferación de macrófagos durante las diferentes fases de una lesión aterosclerótica y muchos de estos macrófagos proliferantes son células espumosas (Rosenfeld and Ross, 1990); en enfermedades glomerulonefríticas, la proliferación de macrófagos está asociada a áreas de severo daño renal (Yang et al., 1998); y en el sistema nervioso central, estados patológicos severos dan lugar a la aparición de macrófagos proliferantes en el cerebro (Perry et al., 1995). Algunas citoquinas presentes en los lugares de inflamación, como M-CSF y GM-CSF, pueden ser responsables de estas respuestas proliferativas. En este trabajo hemos mostrado que la activación de LXR no sólo inhibe la proliferación de los macrófagos y microglía inducida por estas citoquinas *in vitro* sino que además puede inhibir respuestas proliferativas de macrófagos *in vivo*. Para ello, hemos utilizado un modelo de peritonitis en ratón en el que primero se induce un reclutamiento de macrófagos en respuesta a concanavalina A y, a

continuación, se induce su proliferación con M-CSF. Estas observaciones sugieren que la activación de LXR puede proporcionar un mecanismo para limitar la proliferación de los macrófagos en lesiones inflamatorias mientras otras funciones de LXR permiten potenciar el papel de estas células en la resolución de la inflamación.

Como ya hemos comentado, LXR ejerce importantes efectos antiinflamatorios. Estudios iniciales demostraron la capacidad de los agonistas de LXR para transreprimir las vías inflamatorias activadas por TLR3/4 o por el tratamiento con las citoquinas IL-1 β o TNF α (Joseph et al., 2003). Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se ha demostrado que también pueden inhibir la expresión de Il-6, Tnf α e Irf1 en astrocitos activados por IFN- γ (Lee et al., 2009). En este trabajo proporcionamos una visión amplia de los efectos globales de la activación de LXR en la respuesta de los macrófagos a IFN- γ . Los resultados de los perfiles de expresión génica indican numerosas acciones inhibitorias de LXR en la respuesta a IFN- γ . Estos efectos son comparables con el grado de transrepresión que los agonistas de LXR ejercen en los perfiles de expresión génica inducidos tras la activación por TLR3/4 (Ogawa et al., 2005). Aunque en ambos casos se observa la inhibición de genes proinflamatorios como Nos2 o Cxcl10 existen diferencias en las funciones que se observan enriquecidas mediante el análisis de GO. Ogawa et al., (2005) observaron un enriquecimiento en los procesos biológicos de “activación celular”, “metabolismo del nitrógeno”, “respuesta a estímulos externos”, “respuesta a estímulos bióticos”, “respuesta a patógenos/parásitos”, “respuesta a sustancias químicas”, “taxis” o “biosíntesis de MHC de clase II” al analizar las funciones de los genes inducidos por LPS y reprimidos por LXR. En nuestro trabajo, el análisis funcional de los genes inducidos por IFN- γ y reprimidos por GW3965 muestra un enriquecimiento de las términos de GO “regulación de la proliferación celular”, “respuesta inmunológica”, “respuesta de defensa”, “respuesta a hipoxia”, “respuesta inflamatoria”, “respuesta a daño”, “regulación positiva de la actividad hidroxilasa”, “regulación del transporte iónico” y “morfogénesis de una estructura ramificada”.

Nuestros resultados también indican que IFN- γ induce la expresión de la enzima colesterol-25-hidroxilasa (Ch25h), la cual genera 25-hidroxicolesterol, un ligando endógeno de LXR. La inducción de Ch25h también se ha visto en macrófagos estimulados con LPS (Diczfalusy et al., 2009). Estas observaciones

sugieren que IFN- γ podría promover la producción de agonistas endógenos de LXR como mecanismo de freno a sus propias acciones de activación celular.

Aquí mostramos que ambas isoformas de LXR, α y β , contribuyen parcialmente a la represión de genes inducidos por IFN- γ . Esto contrasta con la transrepresión causada por GW3965 sobre la respuesta de fase aguda en el hígado, que está mediada de forma selectiva por LXR β (Venteclef et al., 2010). La transrepresión mediada por LXR ha sido vinculada a la SUMOilación de LXR. En macrófagos murinos, la SUMOilación de LXR activado por GW3965 correlaciona con la interferencia sobre la liberación de los complejos co-represores de los promotores de determinados genes inducidos por LPS (Ghisletti et al., 2007), necesaria para la activación transcripcional. Nuestros estudios indican que la transrepresión de LXR sobre la activación por IFN- γ de los macrófagos implica una inhibición del reclutamiento de STAT1 a las regiones reguladoras de determinados genes inducidos por IFN- γ , como Nos2 y Cxcl11. Sin embargo, no se observan efectos sobre la fosforilación de STAT1. Durante el desarrollo de esta tesis, Lee et al., (2009) publicaron un trabajo que muestra los efectos represores de LXR sobre la activación de astrocitos por IFN- γ . Ellos proponen diferentes mecanismos de SUMOilación para LXR α y LXR β en respuesta a ligandos en este tipo celular y muestran que los LXRs SUMOilados forman un complejo con STAT1 que resulta en la inhibición del reclutamiento de STAT1 al promotor de Irf1 durante la respuesta a IFN- γ , sin afectar a la fosforilación o a la translocación nuclear de STAT1 (Lee et al., 2009). Estas observaciones apoyan la veracidad de nuestros datos. En nuestro trabajo, no obstante, no hemos observado la unión directa STAT1-LXR (datos no mostrados).

En general, no existe un evento único causante de la aparición de enfermedades neurodegenerativas. Se cree que diversos eventos durante la vida del paciente, entre los que se encuentran infecciones microbianas, dan origen a gran número de desórdenes neurodegenerativos. Además, la inflamación parece ser un punto común que media el progreso de muchas enfermedades degenerativas (Block and Hong, 2005). En estadios avanzados de estos desórdenes neurodegenerativos citoquinas endógenas, más que agentes microbianos, contribuyen al mantenimiento de la progresión de la neurodegeneración. En modelos de enfermedades neurodegenerativas como EAE, inducidos mediante el uso de derivados microbianos, se ha observado un

efecto antiinflamatorio de los ligandos de LXR (Hindinger et al., 2006). Nosotros nos preguntamos si podíamos interferir sobre la activación de las células del sistema nervioso central por la citoquina endógena IFN- γ mediante el tratamiento con agonistas de LXR. Hemos utilizado un modelo *in vivo* para evaluar la respuesta aguda a IFN- γ en el sistema nervioso central. Estudios recientes sugieren que IFN- γ puede ser un factor principal en la neurodegeneración inducida por inflamación (Mangano et al., 2011; Mount et al., 2007; Chakrabarty et al., 2011). En correlación con esta sugerencia, mostramos que la inyección intraventricular con IFN- γ resulta en una inducción de la expresión de varias quimioquinas y que el pretratamiento con el agonista de LXR T1317 inhibe su inducción. Además, observamos efectos anti-inflamatorios similares en cultivos primarios de microglía. Estas células, de hecho, experimentan una regulación negativa sobre su proliferación en respuesta a los agonistas de LXR como mostramos en la primera parte de este trabajo. Nuestros datos están en línea con observaciones previas que demuestran un papel antiinflamatorio de los agonistas de LXR en otros modelos de neuroinflamación (Tabla 4). Los efectos negativos sobre la señalización de IFN- γ descritos en este trabajo pueden contribuir a acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras de los agonistas de LXR en el cerebro. Los tratamientos con agonistas de LXR sobre los distintos modelos de enfermedades del sistema nervioso central además de un efecto antiinflamatorio (Tabla 4) se asocian a un aumento de la supervivencia neuronal. LXR induce la expresión de los genes antiapoptóticos AIM, NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) y Bcl211 en macrófagos (Valledor et al., 2004). En este trabajo nos preguntamos si al menos una parte de los efectos neuroprotectores de LXR podría deberse a la inducción de genes antiapoptóticos y no únicamente a la disminución de la inflamación. Nuestros resultados muestran que la activación de LXR no induce de forma significativa la expresión de genes antiapoptóticos en neuronas corticales, lo cual concuerda con la falta de efectos directos de la activación de LXR observados sobre la muerte neuronal en respuesta a estaurosporina y ácido glutámico. No podemos descartar que existan otros eventos de muerte neuronal diferentes a los aquí estudiados sensibles a la inhibición por LXR.

Modelo	Efectos observados	Referencia
Alzheimer (Tg2576)	Disminución del número de células de microglía activadas asociadas a la placa y de los niveles de ARNm de IL-6 en el cerebro.	(Jiang et al., 2008)
EAE (Encefalitis autoinmune experimental)	Reducción de la inflamación, infiltración de linfocitos T CD4+ y macrófagos, expresión de IFN- γ , expresión de MHC de clase II en las células de microglía y desmielinización de la médula espinal asociada con la inflamación.	(Hindinger et al., 2006)
Oclusión de la arteria cerebral central	Reducción del volumen y area infartados. Disminución de la expresión de Nos2, Ptgs2, Mmp9, IL-1 β , IL-6, IL-12p40 y Ccl5 en el cerebro.	(Morales et al., 2008a)
Oclusión de la arteria cerebral central	Disminución del volumen infartado. Reducción de la infiltración de monocitos/macrófagos y de la expresión de Nos2, Ptgs2, Ccl2, Ccl5 e IL-1 β en el cerebro.	(Sironi et al., 2008)
Isquemia cerebral global	Reducción de la localización nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B y disminución de la expresión de Ptgs2 en el cerebro.	(Cheng et al., 2010)

Tabla 4.- Efecto del tratamiento con agonistas de LXR sobre modelos de enfermedades del sistema nervioso central.

Nuestros estudios sugieren que STAT1 ejerce acciones negativas recíprocas sobre la expresión de algunos genes dependientes de LXR, revelando una bidireccionalidad negativa entre ambos factores de transcripción. Concretamente, los genes que codifican para Abca1, Srebp1c y AIM son sensibles a represión mediada por STAT1, mientras que Abcg1, Idol y Mertk no experimentan esta inhibición. En correlación con los efectos negativos sobre la expresión de ABCA1, IFN- γ reprime el flujo de colesterol mediado por LXR a través del aceptor ApoAI. La represión de la expresión de ABCA1 por IFN- γ ha sido previamente descrita. En macrófagos peritoneales se ha propuesto que la expresión basal de ABCA1 está inhibida por IFN- γ mediante una disminución de la estabilidad del ARNm (Alfaro Leon et al., 2005). En las células THP-1 en cambio, IFN- γ inhibe la expresión de ABCA1 en respuesta a 22-R-hidroxicolesterol indirectamente mediante la represión de la expresión de LXR- α (Hao et al., 2009). Aunque no podemos descartar efectos en la estabilidad del ARNm, nuestros datos indican que la señalización de IFN- γ es

capaz de reprimir la actividad del promotor de *Abca1*. Además, en nuestro sistema, $\text{IFN-}\gamma$ no altera la expresión de las isoformas de LXR y no todos los genes diana de LXR están afectados negativamente por la activación de STAT1, así que no podemos concluir que el mecanismo de la inhibición de determinadas respuestas dependientes de LXR dependa de la inhibición de la actividad general de LXR. Curiosamente, observamos que $\text{IFN-}\gamma$ reprime la expresión de $\text{RXR}\alpha$ a nivel de ARNm, sin embargo, esto no se traduce en una disminución en el nivel proteico. Este escenario contrasta con los efectos negativos recíprocos establecidos entre IRF3 y LXR durante la repuesta de los macrófagos a la activación vía TLR3/4. Se ha publicado que IRF3 ejerce una inhibición general sobre la actividad de LXR al menos a través de la competición por el coactivador transcripcional p300/CBP (Castrillo et al., 2003). El hecho de que STAT1 afecte diferencialmente la expresión de *Abca1* y *Abcg1* plantea varias cuestiones. Una cuestión es si LXR hace un uso diferencial de moléculas coactivadoras en los promotores de sus genes diana y STAT1 interfiere específicamente con uno de ellos. Otra cuestión importante es la posible implicación fisiológica de la represión selectiva del flujo de colesterol dependiente de ABCA1 y no de ABCG1 durante la inflamación aguda o crónica mediada por $\text{IFN-}\gamma$. Estudios futuros tendrán que intentar dar una respuesta a estas cuestiones.

Varios grupos han demostrado que el estrés del retículo endoplasmático de los macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios, vía TLR2/3/4 (Erbay et al., 2009; Seimon et al., 2006, 2010) o vía los receptores *scavenger* CD36 y SR-A (Devries-Seimon et al., 2005; Manning-Tobin and Moore, 2009), constituyen un mecanismo adicional implicado en el progreso de la aterosclerosis (revisado en Tabas, 2010). Nuestros datos amplían esta concepción añadiendo a la lista de factores que pueden fomentar la formación de células espumosas una citoquina endógena, el $\text{IFN-}\gamma$.

Como conclusión general de esta parte del trabajo, podemos sugerir que los efectos negativos recíprocos entre $\text{IFN-}\gamma$ /STAT1 y LXR tienen un impacto tanto en la respuesta inmunológica mediada por $\text{IFN-}\gamma$, como se demuestra en el modelo *in vivo* de neuroinflamación inducida por $\text{IFN-}\gamma$, como en la regulación de respuestas específicas inducidas por LXR, incluyendo el flujo de colesterol mediado por ABCA1 (Figura 41).

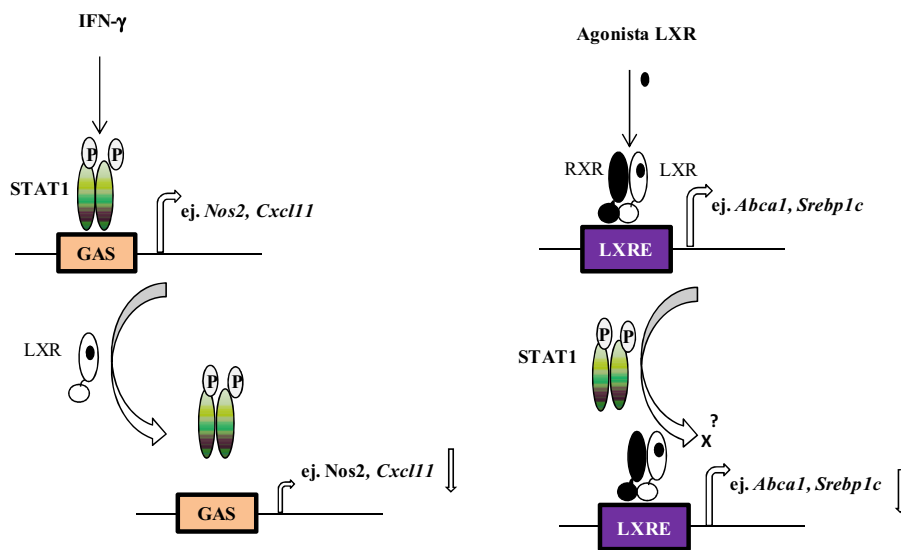


Figura 41.- Efectos negativos recíprocos entre IFN- γ /STAT1 y LXR.

En conjunto, vemos que por un lado, LXR ejerce efectos antiproliferativos y pro-supervivencia en macrófagos. Trabajos recientes han demostrado que tras la fagocitosis de cuerpos apoptóticos se activa la vía de LXR en macrófagos (A-Gonzalez et al., 2009). Además, es conocido que la incorporación de cuerpos apoptóticos inhibe la proliferación de los macrófagos en respuesta a M-CSF a la vez que aumenta su supervivencia (Reddy and Hsiao, 2002). Estas observaciones plantean la cuestión de si la disminución de la proliferación tras la fagocitosis masiva de células es una consecuencia de la activación de LXR a través de la producción de ligandos endógenos de LXR. Tales ligandos podrían proceder del colesterol existente en las biomembranas del material fagocitado. Por otro lado, a los efectos sobre proliferación y supervivencia hay que añadir las acciones antiinflamatorias de LXR sobre la activación del macrófago. La combinación de estos efectos sugiere que la vía LXR puede haber evolucionado como un mecanismo para potenciar el papel del macrófago en la resolución de la inflamación.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La activación de LXR ejerce efectos antiproliferativos en macrófagos derivados de médula ósea, en células de microglía y en un modelo animal de proliferación de macrófagos peritoneales in vivo.
- 2.- La activación de LXR inhibe la expresión proteica de las ciclinas CcnD1 y CcnB1 y de las quinasas Cdk2 y Cdk4 en macrófagos.
3. Los efectos antiproliferativos de LXR en macrófagos no requieren de la actividad de p27 o p21 ni de la inducción de la expresión de ABCA1, ABCG1, SREBP-1c o ApoE.
- 4- La activación de LXR transreprime la expresión de genes proinflamatorios en macrófagos y células de microglía activados por IFN-g. En macrófagos derivados de médula ósea, estos efectos suponen una represión del 38% de la respuesta transcripcional a IFN-g.
- 5.- La activación de LXR ejerce efectos antiinflamatorios en un modelo in vivo de neuroinflamación inducida por IFN-g.
- 6.- La activación de LXR interfiere sobre el reclutamiento de STAT1 al promotor de genes proinflamatorios sin afectar a la fosforilación de STAT1.
- 7.- IFN-g, a través de la activación de STAT1, reprime la expresión selectiva de genes inducidos por la activación de LXR sin afectar al reclutamiento de LXR/RXR al promotor de estos genes. Estas observaciones sugieren la existencia de una comunicación recíproca negativa entre STAT1 y LXR con efectos gen-específicos.

BIBLIOGRAFÍA

A-Gonzalez, N., S.J. Bensinger, C. Hong, S. Beceiro, M.N. Bradley, N. Zelcer, J. Deniz, C. Ramirez, M. Díaz, G. Gallardo, C.R. de Galarreta, J. Salazar, F. Lopez, P. Edwards, J. Parks, M. Andujar, P. Tontonoz, and A. Castrillo. 2009. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity*. 31:245–58.

A-González, N., and A. Castrillo. 2011. Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. *Biochimica et biophysica acta*. 1812:982–94.

Alexopoulou, L., and A. Holt. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 77.

Alfaro Leon, M.L., G.F. Evans, M.W. Farmen, and S.H. Zuckerman. 2005. Post-transcriptional regulation of macrophage ABCA1, an early response gene to IFN- γ . *Biochemical and biophysical research communications*. 333:596–602.

Amati, B., K. Alevizopoulos, and J. Vlach. 1998. Myc and the cell cycle. *Front Biosci*.

Anderson, S.L., T. Shen, J. Lou, L. Xing, N.E. Blachere, P.K. Srivastava, and B.Y. Rubin. 1994. The endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is transcriptionally upregulated in interferon-treated cells. *The Journal of experimental medicine*. 180:1565–9.

Andersson, S., N. Gustafsson, M. Warner, and J.-A. Gustafsson. 2005. Inactivation of liver X receptor beta leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:3857–62.

Ankarcrona, M., J.M. Dypbukt, E. Bonfoco, B. Zhivotovsky, S. Orrenius, S. a Lipton, and P. Nicotera. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 15:961–73.

Anthonisen, E.H., L. Berven, S. Holm, M. Nygård, H.I. Nebb, and L.M. Grønning-Wang. 2010. Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *The Journal of biological chemistry*. 285:1607–15.

Anthony, R., J. Urban, F. Alem, and H. Hamed. 2006. Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature medicine*. 12:955–960.

Arai, S., J.M. Shelton, M. Chen, M.N. Bradley, A. Castrillo, A.L. Bookout, P. a Mak, P. a Edwards, D.J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, and T. Miyazaki. 2005. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development. *Cell metabolism*. 1:201–13.

Armstrong, A.J., A.K. Gebre, J.S. Parks, and C.C. Hedrick. 2010. ATP-binding cassette transporter G1 negatively regulates thymocyte and peripheral

lymphocyte proliferation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 184:173–83.

Asada, M., T. Yamada, H. Ichijo, D. Delia, K. Miyazono, K. Fukumuro, and S. Mizutani. 1999. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *The EMBO journal*. 18:1223–34.

Auer, H., D.L. Newsom, N.J. Nowak, K.M. McHugh, S. Singh, C.-Y. Yu, Y. Yang, G.D. Wenger, J.M. Gastier-Foster, and K. Kornacker. 2007. Gene-resolution analysis of DNA copy number variation using oligonucleotide expression microarrays. *BMC genomics*. 8:111.

Baldán, A., D.D. Bojanic, and P. a Edwards. 2009. The ABCs of sterol transport. *Journal of lipid research*. 50 Suppl:S80–5.

Barreda, D.R., P.C. Hanington, and M. Belosevic. 2004. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental and comparative immunology*. 28:509–54.

Bassermann, F., C. Peschel, and J. Duyster. 2005. Mitotic entry: a matter of oscillating destruction. *Cell cycle*. 1515–1517.

Belmokhtar, C. a, J. Hillion, and E. Ségal-Bendirdjian. 2001. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene*. 20:3354–62.

Benoit, M., B. Desnues, and J.-L. Mege. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 181:3733–9.

Bensinger, S.J., M.N. Bradley, S.B. Joseph, N. Zelcer, E.M. Janssen, M.A. Hausner, R. Shih, J.S. Parks, P. a Edwards, B.D. Jamieson, and P. Tontonoz. 2008. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell*. 134:97–111.

Benveniste, E.N. 1997. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of molecular medicine Berlin Germany*. 75:165–173.

Beretta, L., M. Gabbay, and R. Berger. 1996. Expression of the protein kinase PKR in modulated by IRF-1 and is reduced in 5q-associated leukemias. *Oncogene*.

Berger, A.C., and P. a Roche. 2009. MHC class II transport at a glance. *Journal of cell science*. 122:1–4.

Bernabei, P., and E. Coccia. 2001. Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *Journal of leukocyte biology*.

Bigini, P., and K. Steffensen. 2010. Neuropathologic and Biochemical Changes During Disease Progression in Liver X Receptor -/-Mice, A Model of Adult Neuron Disease. *Journal of Neuropathology & experimental neurology*.

- Billiau, A., H. Heremans, F. Vandekerckhove, R. Dijkmans, H. Sobis, E. Meulepas, and H. Carton. 1988. Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *The Journal of Immunology*. 140:1506–10.
- Blaschke, F., O. Leppanen, Y. Takata, E. Caglayan, J. Liu, M.C. Fishbein, K. Kappert, K.I. Nakayama, A.R. Collins, E. Fleck, W. a Hsueh, R.E. Law, and D. Bruemmer. 2004. Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation research*. 95:e110–23.
- Block, M.L., and J.-S. Hong. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology*. 76:77–98.
- Bodzioch, M., E. Orsó, J. Klucken, T. Langmann, a Böttcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Büchler, M. Porsch-Ozcürümez, W.E. Kaminski, H.W. Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K.J. Lackner, and G. Schmitz. 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature genetics*. 22:347–51.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J.C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology*. 15:749–95.
- Brooks-Wilson, a, M. Marcil, S.M. Clee, L.H. Zhang, K. Roomp, M. van Dam, L. Yu, C. Brewer, J. a Collins, H.O. Molhuizen, O. Loubser, B.F. Ouelette, K. Fichter, K.J. Ashbourne-Excoffon, C.W. Sensen, S. Scherer, S. Mott, M. Denis, D. Martindale, J. Frohlich, K. Morgan, B. Koop, S. Pimstone, J.J. Kastelein, J. Genest, and M.R. Hayden. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature genetics*. 22:336–45.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*.
- Brucet, M., L. Marqués, C. Sebastián, J. Lloberas, and a Celada. 2004. Regulation of murine Tap1 and Lmp2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by STAT1 and IRF-1. *Genes and immunity*. 5:26–35.
- Bruhn, K.W., C. Marathe, A.C. Maretti-Mira, H. Nguyen, J. Haskell, T.A. Tran, V. Vanchinathan, U. Gaur, M.E. Wilson, P. Tontonoz, and N. Craft. 2010. LXR deficiency confers increased protection against visceral Leishmania infection in mice. *PLoS neglected tropical diseases*. 4:e886.
- Burke, F., and R. Knowles. 1995. The role of indoleamine 2, 3- dioxygenase in the anti- tumour activity of human interferon-g in vivo. *International journal of*
- Cao, G., T.P. Beyer, X.P. Yang, R.J. Schmidt, Y. Zhang, W.R. Bensch, R.F. Kauffman, H. Gao, T.P. Ryan, Y. Liang, P.I. Eacho, and X.-C. Jiang. 2002. Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 277:39561–5.

- Carnero, A., and G. Hannon. 1998. The INK4 family of CDK inhibitors. *Current topics in microbiology and immunology*.
- Castrillo, A., S.B. Joseph, S. a Vaidya, M. Haberland, A.M. Fogelman, G. Cheng, and P. Tontonoz. 2003. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Molecular cell*. 12:805–16.
- Celada, A., F.E. Borràs, C. Soler, J. Lloberas, M. Klemsz, C.V. Beverenfl, S. Mckercher, and R.A. Makill. 1996. T h e T r a n s c r i p t i o n F a c t o r P U . 1 I s I n v o l v e d i n M a c r o p h a g e P r o l i f e r a t i o n . *Bone*. 184:61–69.
- Cha, J.-Y., and J.J. Repa. 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *The Journal of biological chemistry*. 282:743–51.
- Chakrabarty, P., C. Ceballos-Diaz, W.-L. Lin, A. Beccard, K. Jansen-West, N.R. McFarland, C. Janus, D. Dickson, P. Das, and T.E. Golde. 2011. Interferon- γ induces progressive nigrostriatal degeneration and basal ganglia calcification. *Nature neuroscience*. 14:694–6.
- Chang. 1995. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *The Journal of experimental medicine*. 181:765–767.
- Chang, C., and J. Fontes. 1994. Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *The Journal of experimental medicine*. 180.
- Chawla, a, W. a Boisvert, C.H. Lee, B. a Laffitte, Y. Barak, S.B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P. a Edwards, L.K. Curtiss, R.M. Evans, and P. Tontonoz. 2001. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Molecular cell*. 7:161–71.
- Chen, J.D., and R.M. Evans. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 377:454–457.
- Chen, M., M.N. Bradley, S.W. Beaven, and P. Tontonoz. 2006. Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS letters*. 580:4835–41.
- Cheng, O., R.P. Ostrowski, W. Liu, and J.H. Zhang. 2010. Activation of liver X receptor reduces global ischemic brain injury by reduction of nuclear factor-kappaB. *Neuroscience*. 166:1101–9.
- Chuu, C.-P., J.M. Kokontis, R. a Hiipakka, and S. Liao. 2007. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *Journal of biomedical science*. 14:543–53.
- Classon, M., and E. Harlow. 2002. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2:910–7.
- Collins, J.L., A.M. Fivush, M. a Watson, C.M. Galardi, M.C. Lewis, L.B. Moore, D.J. Parks, J.G. Wilson, T.K. Tippin, J.G. Binz, K.D. Plunket, D.G. Morgan,

- E.J. Beaudet, K.D. Whitney, S. a Kliewer, and T.M. Willson. 2002. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *Journal of medicinal chemistry*. 45:1963–6.
- Comalada, M., A.F. Valledor, E. Sanchez-Tilló, I. Umbert, J. Xaus, and A. Celada. 2003. Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is mediated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases. *European journal of immunology*. 33:3091–100.
- Comalada, M., J. Xaus, E. Sánchez, A.F. Valledor, and A. Celada. 2004. Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *European journal of immunology*. 34:2257–67.
- Costet, P., Y. Luo, N. Wang, and a R. Tall. 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *The Journal of biological chemistry*. 275:28240–5.
- Courtneidge, S. a, R. Dhand, D. Pilat, G.M. Twamley, M.D. Waterfield, and M.F. Roussel. 1993. Activation of Src family kinases by colony stimulating factor-1, and their association with its receptor. *The EMBO journal*. 12:943–50.
- Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annual review of immunology*.
- Crisafulli, C., E. Mazzon, I. Paterniti, M. Galuppo, P. Bramanti, and S. Cuzzocrea. 2010. Effects of Liver x receptor agonist treatment on signal transduction pathways in acute lung inflammation. *Respiratory research*. 11:19.
- Cuchel, M., and D.J. Rader. 2006. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*. 113:2548–55.
- Cui, W., Y. Sun, Z. Wang, C. Xu, Y. Peng, and R. Li. 2012. Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience*. 210:200–10.
- Dai, Y.-B., X.-J. Tan, W.-F. Wu, M. Warner, and J.-Å. Gustafsson. 2012. Liver X receptor β protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1–6.
- Devries-Seimon, T., Y. Li, P.M. Yao, E. Stone, Y. Wang, R.J. Davis, R. Flavell, and I. Tabas. 2005. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *The Journal of cell biology*. 171:61–73.
- Dick, T., T. Ruppert, and M. Groettrup. 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*. 86:253–262.

- Diczfalusy, U., K.E. Olofsson, A.-M. Carlsson, M. Gong, D.T. Golenbock, O. Rooyackers, U. Fläring, and H. Björkbacka. 2009. Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide. *Journal of lipid research*. 50:2258–64.
- Dominguez-Sola, D., C.Y. Ying, C. Grandori, L. Ruggiero, B. Chen, M. Li, D. a Galloway, W. Gu, J. Gautier, and R. Dalla-Favera. 2007. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*. 448:445–51.
- Donzelli, M., and G.F. Draetta. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports*. 4:671–7.
- Díaz-Delfin, J., M. Morales, and C. Caelles. 2007. Hypoglycemic Action of Thiazolidinediones/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ by Inhibition of the c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathway. *Diabetes*. 56:1865–1871.
- D'Alimonte, I., P. Ballerini, E. Nargi, S. Buccella, P. Giuliani, P. Di Iorio, F. Caciagli, and R. Ciccarelli. 2007. Staurosporine-induced apoptosis in astrocytes is prevented by A1 adenosine receptor activation. *Neuroscience letters*. 418:66–71.
- Eckardstein, A.V. 2001. High density lipoproteins and arteriosclerosis role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, ...*
- Edwards, P. a, H.R. Kast, and A.M. Anisfeld. 2002. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *Journal of lipid research*. 43:2–12.
- El Chartouni, C., C. Benner, M. Eigner, M. Lichtinger, and M. Rehli. 2010. Transcriptional effects of colony-stimulating factor-1 in mouse macrophages. *Immunobiology*. 215:466–74.
- Erbay, E., V. Babaev, and J. Mayers. 2009. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nature medicine*. 15:1383–1391.
- Erbe, D., J. Collins, and L. Shen. 1990. The effect of cytokines on the expression and function of Fc receptors for IgG on human myeloid cells. *Molecular ...*
- Evans, R. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*.
- Fellous, M., U. Nir, D. Wallach, G. Merlin, M. Rubinstein, and M. Revel. 1982. Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79:3082–6.
- Fernández, C., M.D.V.T. Lobo Md, D. Gómez-Coronado, and M. a Lasunción. 2004. Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Experimental cell research*. 300:109–20.

Fero, M.L., M. Rivkin, M. Tasch, P. Porter, C.E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L.H. Tsai, V. Broudy, R.M. Perlmutter, K. Kaushansky, and J.M. Roberts. 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*. 85:733–44.

Fixe, P., and V. Praloran. 1997. Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: structure-function relationships. *European cytokine network*.

Fleckner, J., and P. Martensen. 1995. Differential regulation of the human, interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. *Cytokine*.

Forman, B.M., B. Ruan, J. Chen, G.J. Schroepfer, and R.M. Evans. 1997. The orphan nuclear receptor LXRA α is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:10588–93.

Fukuchi, J., R. a Hiipakka, J.M. Kokontis, S. Hsu, A.L. Ko, M.L. Fitzgerald, and S. Liao. 2004a. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer research*. 64:7682–5.

Fukuchi, J., J.M. Kokontis, R. a Hiipakka, C.-P. Chuu, and S. Liao. 2004b. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer research*. 64:7686–9.

García, M. a, J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas, and M. Esteban. 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 70:1032–60.

Van der Geer, P., and T. Hunter. 1993. Mutation of Tyr697, a GRB2-binding site, and Tyr721, a Pi 3-kinase binding site, abrogates signal transduction by the murine CSF-1 receptor expressed in Rat-2 fibroblasts. *The EMBO journal*. 12:5161–5172.

Gene, T., and O. Consortium. 2001. Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome research*. 11:1425–33.

Gewirtz, a T., T. a Navas, S. Lyons, P.J. Godowski, and J.L. Madara. 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 167:1882–5.

Geyeregger, R., M. Shehata, M. Zeyda, F.W. Kiefer, K.M. Stuhlmeier, E. Porpaczy, G.J. Zlabinger, U. Jäger, and T.M. Stulnig. 2009. Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*. 86:1039–48.

Ghisletti, S., W. Huang, K. Jepsen, C. Benner, G. Hardiman, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. 2009. Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a

corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes & development*. 23:681–93.

Ghisletti, S., W. Huang, S. Ogawa, G. Pascual, M.-E. Lin, T.M. Willson, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. 2007. Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Molecular cell*. 25:57–70.

Gil, M.P., E. Bohn, a K. O'Guin, C.V. Ramana, B. Levine, G.R. Stark, H.W. Virgin, and R.D. Schreiber. 2001. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:6680–5.

Glass, C.K., and S. Ogawa. 2006. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology*. 6:44–55.

Gordon, S., and F.O. Martinez. 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 32:593–604.

Gordon, S., and P.R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*. 5:953–64.

Graña, X., and E. Reddy. 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*.

Groettrup, M., S. Khan, K. Schwarz, and G. Schmidtke. 2001. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie*. 83:367–72.

Groettrup, M., A. Soza, M. Eggers, L. Kuehn, T. Dick, H. Schild, H. Rammensee, U. Koszinowski, and P. Kloetzel. 1996. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature*.

Groot, R. de. 1998. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cellular signalling*. 10:619–628.

Gupta, J.W., M. Kubin, L. Hartman, M. Cassate-ila, and G. Trinchieri. 1992. Induction of Expression of Genes Encoding Components of the Respiratory Burst Oxidase during Differentiation of Human Myeloid Cell Lines Induced by Tumor Necrosis Factor and γ -Interferon. *Cancer Research*.

Hamilton, J.. 1997. CSF-1 signal transduction. *Journal of leukocyte biology*. 62:145–155.

Hamon, Y., C. Broccardo, O. Chambenoit, M.F. Luciani, F. Toti, S. Chaslin, J.M. Freyssinet, P.F. Devaux, J. McNeish, D. Marguet, and G. Chimini. 2000. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature cell biology*. 2:399–406.

Hao, X., D. Cao, Y. Hu, X. Li, X. Liu, J. Xiao, D. Liao, J. Xiang, and C. Tang. 2009. IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRAalpha

in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Atherosclerosis*. 203:417–28.

Harbour, J.W., and D.C. Dean. 2000. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nature cell biology*. 2:E65–7.

Harper, J.W., G. Adami, and N. Wei. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*.

Hartwell, L., and T. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*.

Hazen, S.L. 2008. Oxidized phospholipids as endogenous pattern recognition ligands in innate immunity. *The Journal of biological chemistry*. 283:15527–31.

Heim, M., and I. Kerr. 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science*.

Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda, and S. Akira. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 170:3059–64.

Hickey, W.F., K. Vass, and H. Lassmann. 1992. Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 51:246–256.

Hindinger, C., D.R. Hinton, S.J. Kirwin, R.D. Atkinson, M.E. Burnett, C.C. Bergmann, and S.A. Stohlman. 2006. Liver X Receptor Activation Decreases the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research*. 1234:1225–1234.

Hoberg, J.E., F. Yeung, and M.W. Mayo. 2004. SMRT derepression by the I κ B kinase alpha: a prerequisite to NF- κ B transcription and survival. *Molecular cell*. 16:245–55.

Hsia, E.Y., M.L. Goodson, J.X. Zou, M.L. Privalsky, and H.-W. Chen. 2010. Nuclear receptor coregulators as a new paradigm for therapeutic targeting. *Advanced drug delivery reviews*. 62:1227–37.

Hu, X., and L.B. Ivashkiv. 2009. Cross-regulation of Signaling and Immune Responses by IFN- γ and STAT1. *Immunity*. 31:539–550.

Huang, D.W., B.T. Sherman, and R. a Lempicki. 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*. 37:1–13.

Huang, D.W., B.T. Sherman, and R. a Lempicki. 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 4:44–57.

- Huang, W., S. Ghisletti, K. Saijo, M. Gandhi, M. Aouadi, G.J. Tesz, D.X. Zhang, J. Yao, M.P. Czech, B.L. Goode, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. 2011. Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes. *Nature*. 470:414–418.
- Hörlein, A.J., A.M. Näär, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Söderström, and C.K. Glass. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 377:397–404.
- Igarashi, K., G. Garotta, L. Ozmens, A. Ziemieckij, A.F. Wilksl, A.G. Harpurll, A.C. Lamer, and D.S. Finbloomll. 1994. Interferon- γ Induces Tyrosine Phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *The Journal of biological chemistry*. 14333–14336.
- Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, J. Wang, P.W. Gray, K. Matsushima, and O. Yoshie. 1999. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *International immunology*. 11:81–8.
- Jakobsson, T., E. Treuter, J.-Å. Gustafsson, and K.R. Steffensen. 2012. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1–11.
- Jakobsson, T., N. Venteclef, G. Toresson, A.E. Damdimopoulos, A. Ehrlund, X. Lou, S. Sanyal, K.R. Steffensen, J.-A. Gustafsson, and E. Treuter. 2009. GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus. *Molecular cell*. 34:510–8.
- Janowski, B.A., P.J. Willy, T.R. Devi, J.R. Falck, and D.J. Mangelsdorf. 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR[α]. *Nature*. 383:728–731.
- Jiang, Q., C.Y.D. Lee, S. Mandrekar, B. Wilkinson, P. Cramer, N. Zelcer, K. Mann, B. Lamb, T.M. Willson, J.L. Collins, J.C. Richardson, J.D. Smith, T. a Comery, D. Riddell, D.M. Holtzman, P. Tontonoz, and G.E. Landreth. 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of A β . *Neuron*. 58:681–93.
- Johnson, D.R., and J.S. Pober. 1990. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:5183–7.
- Joseph, S.B., M.N. Bradley, A. Castrillo, K.W. Bruhn, P. a Mak, L. Pei, J. Hogenesch, R.M. O'connell, G. Cheng, E. Saez, J.F. Miller, and P. Tontonoz. 2004. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell*. 119:299–309.

Joseph, S.B., A. Castrillo, B. a Laffitte, D.J. Mangelsdorf, and P. Tontonoz. 2003. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature medicine*. 9:213–9.

Kastan, M.B., and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 432:316–23.

Kelchtermans, H., A. Billiau, and P. Matthys. 2008. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends in immunology*. 29:479–86.

Kennedy, M. a, a Venkateswaran, P.T. Tarr, I. Xenarios, J. Kudoh, N. Shimizu, and P. a Edwards. 2001. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *The Journal of biological chemistry*. 276:39438–47.

Kern, I., and V. Steimle. 1995. The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes. *International immunology*.

Kim, K.H., G.Y. Lee, J.I. Kim, M. Ham, J. Won Lee, and J.B. Kim. 2010. Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *Journal of lipid research*. 51:3425–33.

Kim, K.H., J.M. Yoon, a H. Choi, W.S. Kim, G.Y. Lee, and J.B. Kim. 2009. Liver X receptor ligands suppress ubiquitination and degradation of LXRalpha by displacing BARD1/BRCA1. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 23:466–74.

Kliwer, S.A., J.M. Lehmann, and T.M. Willson. 1999. Orphan Nuclear Receptors: Shifting Endocrinology into Reverse. *Science*. 284:757–760.

Kong, G.Y., Z.C. Peng, C. Costanzo, K. Kristensson, and M. Bentivoglio. 2000. Inducible nitric oxide synthase expression elicited in the mouse brain by inflammatory mediators circulating in the cerebrospinal fluid. *Brain research*. 878:105–18.

Korf, H., and S.V. Beken. 2009. Liver X receptors contribute to the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *The Journal of clinical* 119.

Kurokawa, J., S. Arai, K. Nakashima, H. Nagano, A. Nishijima, K. Miyata, R. Ose, M. Mori, N. Kubota, T. Kadowaki, Y. Oike, H. Koga, M. Febbraio, T. Iwanaga, and T. Miyazaki. 2010. Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. *Cell metabolism*. 11:479–92.

Kurokawa, J., and H. Nagano. 2011. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Kyriakis, J., H. App, and X. Zhang. 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*.

Laffitte, B. a, L.C. Chao, J. Li, R. Walczak, S. Hummasti, S.B. Joseph, A. Castrillo, D.C. Wilpitz, D.J. Mangelsdorf, J.L. Collins, E. Saez, and P. Tontonoz. 2003. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:5419–24.

Laffitte, B.A., J.J. Repa, S.B. Joseph, D.C. Wilpitz, H.R. Kast, D.J. Mangelsdorf, and P. Tontonoz. 2001. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:507–12.

Lafuse, W., D. Brown, L. Castle, and B.S. Zwillig. 1995. IFN- γ increases macrophages cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 57:663–669.

Lah, T., and M. Hawley. 1995. Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsins B and L, in macrophages. *FEBS letters*.

Lawn, R.M., D.P. Wade, M.R. Garvin, X. Wang, K. Schwartz, J.G. Porter, J.J. Seilhamer, A.M. Vaughan, and J.F. Oram. 1999. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway *Rapid*. 25–31.

Lee, J.H., S.M. Park, O.S. Kim, C.S. Lee, J.H. Woo, S.J. Park, E. Joe, and I. Jou. 2009. Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Molecular cell*. 35:806–17.

Lee, M., K. Lu, S. Hazard, and H. Yu. 2001. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nature* 27:79–83.

Lee, S.K., J.H. Kim, Y.C. Lee, J. Cheong, and J.W. Lee. 2000. Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *The Journal of biological chemistry*. 275:12470–4.

Lefterov, I., A. Bookout, Z. Wang, M. Staufenbiel, D. Mangelsdorf, and R. Koldamova. 2007. Expression profiling in APP23 mouse brain: inhibition of Abeta amyloidosis and inflammation in response to LXR agonist treatment. *Molecular neurodegeneration*. 2:20.

Lehmann, J.M., S. a Kliewer, L.B. Moore, T. a Smith-Oliver, B.B. Oliver, J.L. Su, S.S. Sundseth, D. a Winegar, D.E. Blanchard, T. a Spencer, and T.M. Willson. 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *The Journal of biological chemistry*. 272:3137–40.

- Li, A.C., and C. Glass. 2002. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat. Med.* 8:1235–1242.
- Li, A.C., and W. Palinski. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 46:1–39.
- Li, N., R.C. Salter, and D.P. Ramji. 2011. Molecular mechanisms underlying the inhibition of IFN- γ -induced, STAT1-mediated gene transcription in human macrophages by simvastatin and agonists of PPARs and LXRs. *Journal of cellular biochemistry.* 112:675–83.
- Li, X., S. Zhang, G. Blander, J.G. Tse, M. Krieger, and L. Guarente. 2007. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Molecular cell.* 28:91–106.
- Liu, B., H.-M. Gao, and J.-S. Hong. 2003. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environmental Health Perspectives.* 111:1065–1073.
- Liu, C.B., T. Itoh, K. Arai, and S. Watanabe. 1999. Constitutive activation of JAK2 confers murine interleukin-3-independent survival and proliferation of BA/F3 cells. *The Journal of biological chemistry.* 274:6342–9.
- Lu, K., M.H. Lee, S. Hazard, a Brooks-Wilson, H. Hidaka, H. Kojima, L. Ose, a F. Stalenhoef, T. Mietinnen, I. Bjorkhem, E. Bruckert, a Pandya, H.B. Brewer, G. Salen, M. Dean, a Srivastava, and S.B. Patel. 2001. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *American journal of human genetics.* 69:278–90.
- Macaluso, M., M. Montanari, and a Giordano. 2006. Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene.* 25:5263–7.
- Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annual review of immunology.* 14:301–31.
- Macmicking, J., Q. Xie, and C. Nathan. 1997. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE. *Annual review of immunology.*
- Magram, J., S.E. Connaughton, R.R. Warriar, D.M. Carvajal, C.Y. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D. a Faherty, and M.K. Gately. 1996. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity.* 4:471–81.
- Mak, P. a, B. a Laffitte, C. Desrumaux, S.B. Joseph, L.K. Curtiss, D.J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, and P. a Edwards. 2002. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *The Journal of biological chemistry.* 277:31900–8.

- Malumbres, M. 2011. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiological reviews*. 91:973–1007.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews. Cancer*. 1:222–31.
- Mandal, M., and D. Bandyopadhyay. 1998. Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). *Oncogene*.
- Mangano, E.N., D. Litteljohn, R. So, E. Nelson, S. Peters, C. Bethune, J. Boby, and S. Hayley. 2011. Interferon- γ plays a role in paraquat-induced neurodegeneration involving oxidative and proinflammatory pathways. *Neurobiology of aging*.
- Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R.M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83:835–839.
- Manning-Tobin, J., and K. Moore. 2009. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterios and vascular biology and vascular biology*. 29:19–26.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 25:677–86.
- Massagué, J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 432.
- Mathiak, G., G. Grass, T. Herzmann, T. Luebke, C.C. Zetina, S. a Boehm, H. Bohlen, L.F. Neville, and a H. Hoelscher. 2000. Caspase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS-lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. *British journal of pharmacology*. 131:383–6.
- McCarty, M.F. 2006. Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders. *Medical hypotheses*. 67:251–69.
- McCubrey, J., and W. May. 2000. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia: official journal* 9–21.
- Meng, Z.X., J. Nie, J.J. Ling, J.X. Sun, Y.X. Zhu, L. Gao, J.H. Lv, D.Y. Zhu, Y.J. Sun, and X. Han. 2009. Activation of liver X receptors inhibits pancreatic islet beta cell proliferation through cell cycle arrest. *Diabetologia*. 52:125–35.
- Meurs, E., K. Chong, J. Galabru, and N. Thomas. 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*.

Miura, M., and H. Zhu. 1993. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*.

Morales, J.R., I. Ballesteros, J.M. Deniz, O. Hurtado, J. Vivancos, F. Nombela, I. Lizasoain, A. Castrillo, and M. a Moro. 2008a. Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke. *Circulation*. 118:1450–9.

Morales, J.R., I. Ballesteros, J.M. Deniz, O. Hurtado, J. Vivancos, F. Nombela, I. Lizasoain, A. Castrillo, and M. a Moro. 2008b. Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke. *Circulation*. 118:1450–9.

Moresco, E.M.Y., D. LaVine, and B. Beutler. 2011. Toll-like receptors. *Current biology : CB*. 21:R488–93.

Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology*.

Mosser, D.M., and J.P. Edwards. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*. 8:958–69.

Mount, M.P., A. Lira, D. Grimes, P.D. Smith, S. Faucher, R. Slack, H. Anisman, S. Hayley, and D.S. Park. 2007. Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:3328–37.

Nagy, L., H.Y. Kao, J.D. Love, C. Li, E. Banayo, J.T. Gooch, V. Krishna, K. Chatterjee, R.M. Evans, and J.W. Schwabe. 1999. Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes & development*. 13:3209–16.

Nakamura, K., M. a Kennedy, A. Baldán, D.D. Bojanic, K. Lyons, and P. a Edwards. 2004. Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 279:45980–9.

Nestel, P., a Hoang, D. Sviridov, and N. Straznicky. 2012. Cholesterol efflux from macrophages is influenced differentially by plasmas from overweight insulin-sensitive and -resistant subjects. *International journal of obesity (2005)*. 36:407–13.

Nigg, E. a. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:21–32.

Novak, U., a G. Harpur, L. Paradiso, V. Kanagasundaram, a Jaworowski, a F. Wilks, and J. a Hamilton. 1995. Colony-stimulating factor 1-induced STAT1 and STAT3 activation is accompanied by phosphorylation of Tyk2 in macrophages and Tyk2 and JAK1 in fibroblasts. *Blood*. 86:2948–56.

- Ogawa, M. 1993. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 81:2844–2853.
- Ogawa, S., J. Lozach, C. Benner, G. Pascual, R.K. Tangirala, S. Westin, A. Hoffmann, S. Subramaniam, M. David, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. 2005. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell*. 122:707–21.
- Ogawa, S., J. Lozach, K. Jepsen, D. Sawka-Verhelle, V. Perissi, R. Sasik, D.W. Rose, R.S. Johnson, M.G. Rosenfeld, and C.K. Glass. 2004. A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:14461–6.
- Oram, J.F., and a M. Vaughan. 2000. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Current opinion in lipidology*. 11:253–60.
- Out, R., W. Jessup, W. Le Goff, M. Hoekstra, I.C. Gelissen, Y. Zhao, L. Kritharides, G. Chimini, J. Kuiper, M.J. Chapman, T. Huby, T.J.C. Van Berkel, and M. Van Eck. 2008. Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circulation research*. 102:113–20.
- Owens, T. 2002. Identification of new therapeutic targets for prevention of CNS inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 6:203–215.
- Owens, T., H. Wekerle, and J. Antel. 2001. Genetic models for CNS inflammation. *Nature Medicine*. 7:161–166.
- Palvimo, J.J. 2007. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochemical Society Transactions*. 35:1405–1408.
- Panitch, H.S., R.L. Hirsch, A.S. Haley, and K.P. Johnson. 1987. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon.
- Pascual-García, M., and A.F. Valledor. 2012. Biological roles of liver x receptors in immune cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 60:235–49.
- Pavletich, N.P. 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of molecular biology*. 287:821–8.
- Peet, D.J., S.D. Turley, W. Ma, B. a Janowski, J.M. Lobaccaro, R.E. Hammer, and D.J. Mangelsdorf. 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. 93:693–704.
- Perry, V.H., M.D. Bell, H.C. Brown, and M.K. Matyszak. 1995. Inflammation in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*. 5:636–41.

Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological reviews*. 202:8–32.

Pien, G.C., a R. Satoskar, K. Takeda, S. Akira, and C. a Biron. 2000. Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 165:4787–91.

Planas-Silva, M., and R. Weinberg. 1997. The restriction point and control of cell proliferation. *Current opinion in cell biology*. 13:768–772.

Poukka, H., U. Karvonen, O. a Janne, and J.J. Palvimo. 2000. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:14145–50.

Radi, R., and J. Beckman. 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry*

Ramana, C.V., M.P. Gil, R.D. Schreiber, and G.R. Stark. 2002. γ -dependent pathways in IFN- γ signaling. *Trends in Immunology*. 23:96–101.

Reddy, S., and K. Hsiao. 2002. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of. *The Journal of*

Reiner, S., and R. Locksley. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual review of immunology*.

Ren, B., H. Cam, Y. Takahashi, T. Volkert, J. Terragni, R.A. Young, and B.D. Dynlacht. 2002. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair , replication , and G 2 / M checkpoints. 2:245–256.

Repa, J.J. 2000a. Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science*. 289:1524–1529.

Repa, J.J. 2000b. Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science*. 289:1524–1529.

Repa, J.J., K.E. Berge, C. Pomajzl, J. a Richardson, H. Hobbs, and D.J. Mangelsdorf. 2002. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *The Journal of biological chemistry*. 277:18793–800.

Repa, J.J., H. Li, T.C. Frank-Cannon, M. a Valasek, S.D. Turley, M.G. Tansey, and J.M. Dietschy. 2007. Liver X receptor activation enhances cholesterol loss from the brain, decreases neuroinflammation, and increases survival of the NPC1 mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:14470–80.

Repa, J.J., S.D. Turley, J.-M.A. Lobaccaro, J. Medina, L. Li, K. Lustig, B. Shan, R.A. Heyman, J.M. Dietschy, and D.J. Mangelsdorf. 2000. Regulation of

Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science*. 289:1524–1529.

Ricote, M., A.F. Villedor, and C.K. Glass. 2004. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 24:230–9.

Rock, C.O., J.L. Cleveland, and S. Jackowski. 1992. Macrophage growth arrest by cyclic AMP defines a distinct checkpoint in the mid-G1 stage of the cell cycle and overrides constitutive c-myc expression. *Molecular and cellular biology*. 12:2351–8.

Rosenfeld, M.E., and R. Ross. 1990. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 10:680–687.

Rust, S., M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J.C. Piette, J.F. Deleuze, H.B. Brewer, N. Duverger, P. Denèfle, and G. Assmann. 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature genetics*. 22:352–5.

Saha, B., S. Jyothi Prasanna, B. Chandrasekar, and D. Nandi. 2010. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 50:1–14.

Samuel, C. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*. 14:778–809.

Sarrias, M.R., O. Padilla, Y. Monreal, M. Carrascal, J. Abian, J. Vives, J. Yélamos, and F. Lozano. 2004. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpa. *Tissue antigens*. 63:335–44.

Lo Sasso, G., N. Celli, M. Caboni, S. Murzilli, L. Salvatore, A. Morgano, M. Vacca, T. Pagliani, P. Parini, and A. Moschetta. 2010. Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 51:1334–44.

Saura, J., J.M. Tusell, and J. Serratosa. 2003. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*. 44:183–9.

Schindler, H., M.B. Lutz, M. Rölinghoff, and C. Bogdan. 2001. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 166:3075–82.

Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume. 2004. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 75.

Schultz, J.R., H. Tu, A. Luk, J.J. Repa, J.C. Medina, L. Li, S. Schwendner, S. Wang, M. Thoolen, D.J. Mangelsdorf, K.D. Lustig, and B. Shan. 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development*. 2831–2838.

Scott, R.S., E.J. McMahon, S.M. Pop, E. a Reap, R. Caricchio, P.L. Cohen, H.S. Earp, and G.K. Matsushima. 2001. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*. 411:207–11.

Seder, R.A., and W.E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annual review of immunology*.

Seimon, T. a, M.J. Nadolski, X. Liao, J. Magallon, M. Nguyen, N.T. Feric, M.L. Koschinsky, R. Harkewicz, J.L. Witztum, S. Tsimikas, D. Golenbock, K.J. Moore, and I. Tabas. 2010. Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell metabolism*. 12:467–82.

Seimon, T. a, A. Obstfeld, K.J. Moore, D.T. Golenbock, and I. Tabas. 2006. Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:19794–9.

Sen, G. 2001. Viruses and interferons. *Annual Reviews in Microbiology*.

Sethna, M.P., and L.A. Lampson. 1991. Immune modulation within the brain: recruitment of inflammatory cells and increased major histocompatibility antigen expression following intracerebral injection of interferon-gamma. *Journal of Neuroimmunology*. 34:121–132.

Sher, A., and R.L. Coffman. 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual review of immunology*.

Sherr, C.J., and J.M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*. 9:1149–1163.

Shurtleff, S.A., J.R. Downing, C.O. Rock, S.A. Hawkins, M.F. Roussel, and C.J. Sherr. 1990. Structural features of the colony-stimulating factor 1 receptor that affect its association with phosphatidylinositol 3-kinase. *The EMBO journal*. 9:2415–2421.

Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *Journal of clinical investigation*. 122:787–795.

Simenc, J., and M. Lipnik-Štangelj. 2012. Staurosporine induces apoptosis and necroptosis in cultured rat astrocytes. *Drug and chemical toxicology*. 1–7.

Simmons, R.D., and D.O. Willenborg. 1990. Direct injection of cytokines into the spinal cord causes autoimmune encephalomyelitis-like inflammation. *Journal of the Neurological Sciences*. 100:37–42.

De Simone, R., G. Levi, and F. Aloisi. 1998. Interferon gamma gene expression in rat central nervous system glial cells. *Cytokine*. 10:418–422.

Sironi, L., N. Mitro, M. Cimino, P. Gelosa, U. Guerrini, E. Tremoli, and E. Saez. 2008. Treatment with LXR agonists after focal cerebral ischemia prevents brain damage. *FEBS letters*. 582:3396–400.

- Stout, R.D., and J. Suttles. 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of leukocyte biology*. 76:509–513.
- Suto, R., and P.K. Srivastava. 1995. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science*.
- Tabas, I. 2010. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circulation research*. 107:839–50.
- Tarling, E.J., and P. a Edwards. 2011. ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:19719–24.
- Taylor, W. 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2, 3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB journal*.
- Tian, S., H. Poukka, J.J. Palvimo, and O.A. Jänne. 2002. Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *The Biochemical journal*. 367:907–911.
- Tiefenbrun, N., D. Melamed, N. Levy, D. Resnitzky, I. Hoffman, S.I. Reed, and a Kimchi. 1996. Alpha interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A genes, leading to a reversible G0-like arrest. *Molecular and cellular biology*. 16:3934–44.
- Torra, I.P., N. Ismaili, J.E. Feig, C.-F. Xu, C. Cavasotto, R. Pancratov, I. Rogatsky, T. a Neubert, E. a Fisher, and M.J. Garabedian. 2008. Phosphorylation of liver X receptor alpha selectively regulates target gene expression in macrophages. *Molecular and cellular biology*. 28:2626–36.
- Treuter, E., and N. Venteclef. 2011. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochimica et biophysica acta*. 1812:909–18.
- Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology*.
- Vadiveloo, P.K. 1999. Macrophages--proliferation, activation, and cell cycle proteins. *Journal of leukocyte biology*. 66:579–82.
- Valledor, a F., F.E. Borràs, M. Cullell-Young, and a Celada. 1998. Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *Journal of leukocyte biology*. 63:405–17.
- Valledor, a F., M. Comalada, J. Xaus, and a Celada. 2000. The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *The Journal of biological chemistry*. 275:7403–9.
- Valledor, a F., J. Xaus, L. Marquès, and a Celada. 1999. Macrophage colony-stimulating factor induces the expression of mitogen-activated protein kinase

phosphatase-1 through a protein kinase C-dependent pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 163:2452–62.

Valledor, A.F., L. Arpa, E. Sánchez-Tilló, M. Comalada, C. Casals, J. Xaus, C. Caelles, J. Lloberas, and A. Celada. 2008. IFN- γ -mediated inhibition of MAPK phosphatase expression results in prolonged MAPK activity in response to M-CSF and inhibition of proliferation. *Blood*. 112:3274–82.

Valledor, A.F., L.-C. Hsu, S. Ogawa, D. Sawka-Verhelle, M. Karin, and C.K. Glass. 2004. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:17813–8.

Valledor, A.F., J. Lloberas, and A. Celada. 2010. Macrophage Foam Cells. *eLS*.

Vedin, L.-L., S. a Lewandowski, P. Parini, J.-A. Gustafsson, and K.R. Steffensen. 2009. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 30:575–9.

Vela, J.M., A. Yáñez, B. González, and B. Castellano. 2002. Time course of proliferation and elimination of microglia/macrophages in different neurodegenerative conditions. *Journal of neurotrauma*. 19:1503–20.

Venkateswaran, a, B. a Laffitte, S.B. Joseph, P. a Mak, D.C. Wilpitz, P. a Edwards, and P. Tontonoz. 2000. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:12097–102.

Venteclef, N., T. Jakobsson, A. Ehrlund, A. Damdimopoulos, L. Mikkonen, E. Ellis, L.-M. Nilsson, P. Parini, O. a Jänne, J.-A. Gustafsson, K.R. Steffensen, and E. Treuter. 2010. GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LRH-1 and LXRBeta in the hepatic acute phase response. *Genes & development*. 24:381–95.

Voorhuis, J.A., B.M. Uitdehaag, C.J. De Groot, P.H. Goede, P.H. Van Der Meide, and C.D. Dijkstra. 1990. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by intraventricular administration of interferon-gamma in Lewis rats. *Clinical and Experimental Immunology*. 81:183–188.

Wagner, B.L., A.F. Valledor, G. Shao, C.L. Daige, E.D. Bischoff, M. Petrowski, K. Jepsen, S.H. Baek, R.A. Heyman, M.G. Rosenfeld, I.G. Schulman, and C.K. Glass. 2003. Promoter-Specific Roles for Liver X Receptor / Corepressor Complexes in the Regulation of ABCA1 and SREBP1 Gene Expression. *Molecular and cellular biology*. 23:5780–5789.

Wallach, D. 1982. Preferential effect of I^3 interferon on the synthesis of HLA antigens and their mRNAs in human cells. *Nature*.

Wang, L., G.U. Schuster, K. Hultenby, Q. Zhang, S. Andersson, and J.-A. Gustafsson. 2002. Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:13878–83.

Wang, N., D. Lan, W. Chen, F. Matsuura, and A.R. Tall. 2004. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:9774–9.

Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*. 82:241–50.

Xaus, J., M. Cardó, a F. Valledor, C. Soler, J. Lloberas, and a Celada. 1999. Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity*. 11:103–13.

Xue, L., S. Chiu, and N.L. Oleinick. 2003. Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. *Experimental Cell Research*. 283:135–145.

Yamamoto, T., H. Shimano, N. Inoue, Y. Nakagawa, T. Matsuzaka, A. Takahashi, N. Yahagi, H. Sone, H. Suzuki, H. Toyoshima, and N. Yamada. 2007. Protein Kinase A Suppresses Sterol Regulatory Element-binding Protein-1C Expression via Phosphorylation of Liver X Receptor in the Liver *. *282:11687–11695*.

Yang, N., N.M. Isbel, D.J. Nikolic-Paterson, Y. Li, R. Ye, R.C. Atkins, and H.Y. Lan. 1998. Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney international*. 54:143–51.

Yoshida, A., and Y. Koide. 1994. IFN- induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochemical and biophysical research communications*.

Yoshikawa, T., H. Shimano, M. Amemiya-kudo, N. Yahagi, A.H. Hasty, T. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K.E.N. Ohashi, J. Osuga, K. Harada, T. Gotoda, S. Kimura, and S. Ishibashi. 2001. Identification of Liver X Receptor-Retinoid X Receptor as an Activator of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c Gene Promoter. *Molecular and cellular biology*. 21:2991–3000.

Yu, L., J. York, K. von Bergmann, D. Lutjohann, J.C. Cohen, and H.H. Hobbs. 2003. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *The Journal of biological chemistry*. 278:15565–70.

Yusa, S., S. Ohnishi, T. Onodera, and T. Miyazaki. 1999. AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF-beta1. *European journal of immunology*. 29:1086–93.

Zelcer, N., C. Hong, R. Boyadjian, and P. Tontonoz. 2009. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science (New York, N.Y.)*. 325:100–4.

- Zelcer, N., and N. Khanlou. 2007. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Zelcer, N., and P. Tontonoz. 2006. Review series Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *Pathology*. 116:607–614.
- Zetterberg, a, and O. Larsson. 1985. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:5365–9.
- Zhang, Y., J.J. Repa, K. Gauthier, and D.J. Mangelsdorf. 2001. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *The Journal of biological chemistry*. 276:43018–24.
- Zhao, A., J. Urban, R. Anthony, and R. Sun. 2008. Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. *Gastroenterology*. 135:217–225.
- Zhu, X., Z. Wen, L.Z. Xu, and J.E. Darnell. 1997. Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Molecular and cellular biology*. 17:6618–23.

APÉNDICE



CHECK OUT OUR MONTHLY PROMOTIONS ON:

TLRs • Inflammation • Dendritic Cell - T Cell Modulators • Host Defense

BRIDGING INNATE & ADAPTIVE IMMUNITY



Liver X Receptors Inhibit Macrophage Proliferation through Downregulation of Cyclins D1 and B1 and Cyclin-Dependent Kinases 2 and 4

This information is current as of March 16, 2011

Mónica Pascual-García, José M. Carbó, Theresa León, Jonathan Matalonga, Ruud Out, Theo Van Berkel, Maria-Rosa Sarrias, Francisco Lozano, Antonio Celada and Annabel F. Valledor

J Immunol; Prepublished online 11 March 2011;
doi:10.4049/jimmunol.1000585

<http://www.jimmunol.org/content/early/2011/03/11/jimmunol.1000585>

Supplementary Data

<http://www.jimmunol.org/content/suppl/2011/03/11/jimmunol.1000585.DC1.html>

Subscriptions

Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at <http://www.jimmunol.org/subscriptions>

Permissions

Submit copyright permission requests at <http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts

Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at <http://www.jimmunol.org/etoc/subscriptions.shtml/>

Advance online articles have been peer reviewed and accepted for publication but have not yet appeared in the paper journal (edited, typeset versions may be posted when available prior to final publication). Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994. Copyright ©2011 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Liver X Receptors Inhibit Macrophage Proliferation through Downregulation of Cyclins D1 and B1 and Cyclin-Dependent Kinases 2 and 4

Mónica Pascual-García,* José M. Carbó,* Theresa León,* Jonathan Matalonga,*
Ruud Out,† Theo Van Berkel,† Maria-Rosa Sarrias,‡ Francisco Lozano,§,¶
Antonio Celada,||,# and Annabel F. Valledor*

Macrophages serve essential functions as regulators of immunity and homeostasis, and their proliferation contributes to pathogenesis of certain disorders. In this report, we show that induction of macrophage proliferation by the growth factor M-CSF is negatively modulated by agonists that activate the nuclear receptor liver X receptor (LXR), both in vitro and in vivo. Both isoforms LXR α and β are involved in the antiproliferative actions of LXR ligands in macrophages. In contrast, M-CSF does not exert negative effects on LXR-mediated gene expression. Treatment with LXR agonists results in the accumulation of macrophages in the G₀/G₁ phase of the cell cycle without affecting ERK-1/2 phosphorylation. The use of small interfering RNA or genetically modified mice revealed that, in contrast to other cellular models, functional expression of either the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 or the cholesterol transporters ATP-binding cassette A1 or ATP-binding cassette G1 was not required for the antiproliferative effects of LXR agonists in macrophages. Western blot analysis revealed that protein expression of key molecules that regulate progression through the cell cycle, such as cyclins D1 and B1 and cyclin-dependent kinases 2 and 4, was downregulated upon LXR activation. These observations suggest a role for LXR agonists in limiting macrophage proliferative responses associated to pathogenic disorders. *The Journal of Immunology*, 2011, 186: 000–000.

Macrophages serve essential functions as regulators of immunity and homeostasis (1). Macrophage activities include the production of cytokines and other signaling molecules that amplify acute inflammatory responses, Ag presentation and modulation of T cell responses, and the involvement

in cholesterol homeostasis (2). Regulation of macrophage proliferation, differentiation, and survival is critical to the overall control of the magnitude, duration, and characteristics of immune and homeostatic responses (3). Among the growth factors that influence myeloid differentiation, M-CSF acts specifically on bone marrow precursors committed to the monocytic/macrophagic lineage to promote their proliferation and differentiation (4). In addition, M-CSF prolongs macrophage survival and enhances their functional activities in vitro (5, 6). Effects of M-CSF are mediated through a type III tyrosine kinase receptor, which is encoded by the proto-oncogene *Fms*. Binding of M-CSF induces dimerization of this receptor and autophosphorylation of its cytoplasmic tyrosine residues (7, 8), which then associate with a large number of proteins containing Src homology 2 domains that consequently activate numerous signaling pathways. Among these pathways, activation of the MEK/ERK cascade is required for macrophage proliferation (9). At the level of transcription, M-CSF signaling induces the expression of genes associated with progression through the cell cycle, including immediate early genes such as *Myc* and delayed early genes such as D-type cyclins (10). D-type cyclins form complexes with cyclin-dependent kinases (CDK) 4 and 6, and their activity is crucial for the progression into the S phase of the cell cycle (11). The expression of cyclin E is also induced in response to M-CSF, although at later stages during G₁. Cyclin E interacts with CDK2 and helps maintain the retinoblastoma protein in a hyperphosphorylated state during late G₁-to-S transition.

Nuclear receptors constitute a family of ligand-dependent transcription factors that regulate diverse aspects of development and homeostasis (12). Liver X receptors (LXRs) represent a subset of the nuclear receptor superfamily that are regulated by oxidized forms of cholesterol (oxysterols) and intermediate products of the cholesterol biosynthetic pathway (13). Two LXR isoforms have

*Nuclear Receptor Group, Department of Physiology, School of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; †Division of Biopharmaceutics, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Leiden University, 2300 RA Leiden, The Netherlands; ‡Health Sciences Research Institute, “Germans Trias i Pujol” Foundation, 08916 Badalona, Spain; §Servei d’Immunologia, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain; ¶Department of Cellular Biology, Immunology and Neurosciences, School of Medicine, University of Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; ||Macrophage Biology Group, Institute for Research in Biomedicine, 08028 Barcelona, Spain; and #Department of Physiology, School of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Received for publication February 19, 2010. Accepted for publication February 13, 2011.

This work was supported by grants from the Marie Curie International Reintegration Program (IRG-031137), the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2007-63543), and the Fundació Marató de TV3 (080930) (to A.F.V.). M.P.-G. and J.M.C. are recipients of fellowships from the Spanish Ministry of Education (Formación del Profesorado Universitario and Beca de colaboración en departamentos, respectively). J.M. is the recipient of a Formación de Personal Investigador fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation. M.-R.S. is supported by a grant from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FISCP08/124).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Annabel F. Valledor, Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, planta 3, 08028 Barcelona, Spain. E-mail address: afernandezvalledor@ub.edu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: ABCA1, ATP-binding cassette A1; ABCG1, ATP-binding cassette G1; AIM, apoptosis inhibitory factor secreted by macrophages; *Apoc2*, apolipoprotein CII; APOE, apolipoprotein E; BMDM, bone marrow-derived macrophage; CCNB1, cyclin B1; CCND1, cyclin D1; CDK, cyclin-dependent kinase; L-cell cm, L-cell conditioned medium; LXR, liver X receptor; *Pltp*, phospholipid transfer protein; siRNA, small interfering RNA; SKP2, S phase kinase-associated protein 2; *Srebp-1c*, sterol response element binding protein-1c; wT, wild-type.

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

been identified, LXR α (*Nr1h3*) and β (*Nr1h2*), encoded by distinct genes. To regulate positively gene expression, LXRs form obligate heterodimers with retinoid X receptors and bind to their target genes by recognizing specific LXR response elements (14). At the physiological level, LXRs play important roles as integrators of metabolic and inflammatory signaling (reviewed in Ref. 15). Upon activation by oxysterols, LXRs activate transcription of genes involved in cholesterol and fatty acid homeostasis, such as the cholesterol transporters ATP-binding cassette A1 (*Abca1*) and ATP-binding cassette G1 (*Abcg1*) and the sterol response element binding protein-1c (*Srebp-1c*). LXR activity also inhibits transcriptional responses to activation of the TLR4 in macrophages by antagonizing the actions of NF- κ B (16) through a process involving protein sumoylation (17). Moreover, LXR activation has been shown to enhance macrophage survival during growth factor deprivation and bacterial infection through the induction of an apoptosis inhibitory protein secreted by macrophages (AIM/SP α) (18, 19).

Recent findings have provided evidence that LXRs also regulate proliferation in several cellular models (20–22). Macrophage proliferation plays an important role in the pathogenesis of a number of diseases, including atherosclerosis (23). We therefore investigated whether macrophage proliferation is regulated by the LXR pathway. In this report, we show that LXR agonists inhibit primary macrophage proliferation in response to the growth factor M-CSF, both in vitro and in vivo, leading to accumulation of cells in the G₀/G₁ phase of the cell cycle. The antiproliferative actions of LXR agonists in macrophages were independent of functional expression of p27KIP1 and the cholesterol transporters ABCA1 or ABCG1. LXR activation resulted in decreased expression of several proteins that mediate progression through the G₁ phase or entry into the S phase, such as cyclin D1 (CCND1), CDK2, and CDK4, without affecting their mRNA levels. The expression of cyclin B1 (CCNB1), which participates in mitotic progression, was also downregulated. Our findings suggest a role for LXR agonists in limiting macrophage proliferative responses in the context of inflammation.

Materials and Methods

Reagents

Murine rM-CSF was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Murine rIFN- γ was obtained from Pierce Biotechnology (Rockford, IL). T0901317 (T1317) was purchased from Cayman Europe (Tallinn, Estonia). GW3965, 24, 25-epoxycholesterol, probucol, Con A, and LPS were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Murine rIL-3 was obtained from PeproTech (Rocky Hill, NJ).

Cell culture and animal models

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were obtained from 7-wk-old C57BL/6 mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) as described (24). Bone marrow precursors were differentiated into macrophages in DMEM (PAA Laboratories, Pasching, Austria), supplemented with 20% heat-inactivated FCS (PAA Laboratories) and 30% L-cell conditioned medium (L-cell cm). Primary microglia were obtained from the brain cortex of neonatal mice as described (25), with some modifications. Briefly, cortical tissues were homogenized and incubated in tissue-culture plates in the presence of DMEM/10% heat-inactivated FCS. Confluent mixed glial cultures were subjected to mechanical detachment, and microglia were selected by adherence to plastic flasks for 3 h. These microglial populations were >95% pure as measured by FACS analysis using FITC-conjugated anti-mouse F4/80 (eBioscience, San Diego, CA).

L-cell cm was obtained from L929 cells grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS. In some experiments, L-cell cm was used as a source of M-CSF. GM-CSF-containing medium was obtained from the fibroblast cell line J558L cultured in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS.

rAIM was expressed in human embryonic kidney cells (HEK-293 EBNA), as performed previously for human AIM/SP α (26). Briefly, mouse *Aim*

cDNA was obtained by reverse transcription of mouse spleen total RNA and subsequent PCR amplification with specific primers 3'-GCCCGGCTAGCGGAGTCTCCAACCAAAGTG-5' and 3'-CGCGCGGATCCTCACACATCAAAGTCTG-5', which incorporate NheI and BamHI restriction sites, respectively. The PCR products were cloned into the pCEP-Pu vector, a kind gift from Drs. T Sasaki and R. Timpl (Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany), and transfected into HEK-293-EBNA cells. *Aim*-transfected cells were selected in DMEM/10% FCS containing 250 μ g/ml G418 and 1 μ g/ml puromycin (Sigma-Aldrich). rAIM expression was confirmed by Western blot analysis with specific Abs. Cell transfectants expressing AIM or untransfected control cells were grown to confluence and exchanged into serum-free medium. The medium was collected twice every 72 h.

LXR-deficient mice (27, 28) in C57BL/6 background were kindly donated by Dr. David Mangelsdorf (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX). p27KIP1-deficient mice, originally generated by Dr. Jim Roberts (29), were kindly provided by Dr. Manuel Serrano (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain). ABCG1-null mice were purchased from Deltagen (San Carlos, CA) (30). ABCA1-deficient mice and apolipoprotein E (APOE)-deficient mice, initially obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), were kindly provided by Dr. Joan Carles Escolà-Gil (Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain).

All of the protocols requiring animal manipulation have been approved by the ethical committee for experimentation with animals at Parc Científic de Barcelona and Universitat de Barcelona.

Proliferation assay

Cell proliferation was measured as previously described (31), with minor modifications. Quiescent macrophages were stimulated with rM-CSF for 24 h. [³H]thymidine (1 μ Ci/ml; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) was added 6 h before the end of the experiment. The cells were fixed in 70% methanol, washed in 10% TCA, and lysed in 1% SDS/0.3 M NaOH. Radioactivity was counted by liquid scintillation using a 1400 Tri-Carb Packard counter (GMI, Minneapolis, MN). Each point was performed in triplicate, and the results were expressed as the mean \pm SD. To assess microglial proliferation, microglial populations were incubated with DMEM-10% FCS and L-cell cm. [³H]thymidine incorporation was determined as described above.

Alternatively, macrophages were incubated with L-cell cm and LXR agonists for several periods of time (up to 96 h). The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion with a hemacytometer. Each point was performed in triplicate, and the results were expressed as the mean \pm SD.

Analysis of DNA content by flow cytometry

Cells (10⁶) were fixed in 70% ethanol, washed in PBS, and incubated in PBS supplemented with 0.05% Triton X-100, 5 μ g/ml propidium iodide, and 0.5 μ g/ml RNase A (Sigma-Aldrich) for 1 h. Propidium iodide staining was measured using a Cytomics FC500 MPL flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Nuclei (12,000) were counted for each histogram and cell cycle distributions, as well as the percentage of cells in sub-G₀/G₁, were analyzed with the multicycle program (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

In vivo determination of macrophage proliferative responses

A model of in vivo peritonitis was induced in 6–8-wk-old mice (C57BL/6) by i.p. injection of Con A (40 μ g/animal in 1 ml PBS) (Sigma-Aldrich). Three days later, in vivo macrophage proliferation was induced by i.p. injection of 5% L-cell cm in 2 ml DMEM. LXR activation was induced by i.p. injection of T1317 (10 mg/kg) both 18 h before and simultaneously to the proliferating agent. Positive and negative control animals were administered two injections of vehicle (DMSO in DMEM). The cells were obtained by peritoneal lavage 24 h after the last i.p. injection. The cells were fixed in 70% ethanol (in PBS) and subjected to propidium iodide staining as described above. FITC-conjugated Abs against the macrophage surface marker F4/80 were used to determine which of the populations detected by forward scatter/side scatter analysis corresponded to macrophages. For each sample, the macrophage population was gated, and cell cycle distributions were determined as described above. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon/Mann-Whitney *U* test.

RNA extraction and quantitative real-time PCR analysis

Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen, San Diego, CA) as recommended by the manufacturer. For cDNA synthesis, 1 μ g RNA was subjected to reverse transcription using M-MLV Reverse transcriptase

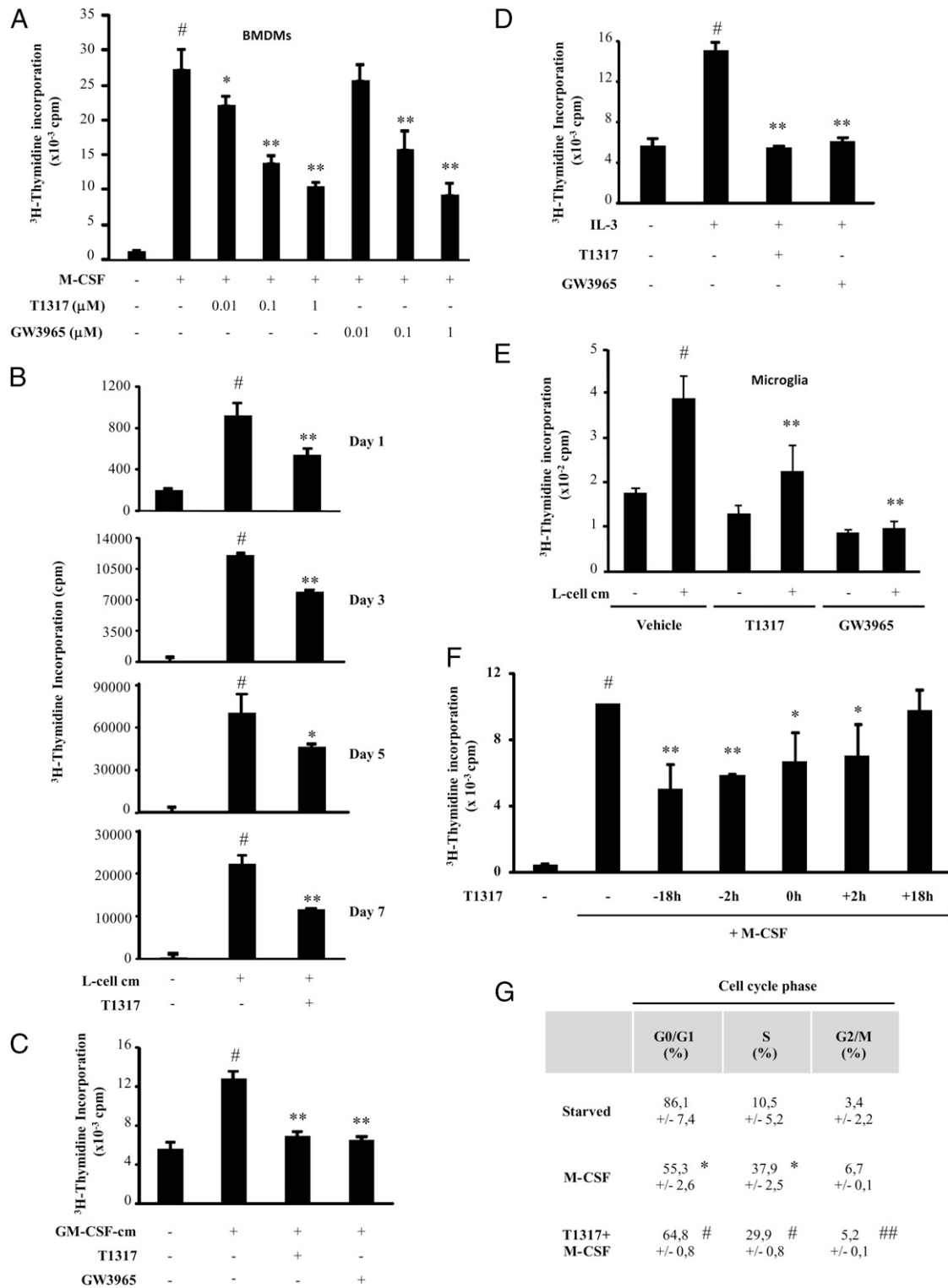


FIGURE 1. LXR agonists inhibit macrophage proliferation in a dose-dependent manner. **A**, BMDMs (10^5 cells/well) were incubated without M-CSF for 24 h. The cells were treated with the LXR agonists T1317 and GW3965 at the indicated concentrations (8 h before the addition of M-CSF). Control cells were treated with vehicle (DMSO). The cells were then incubated with murine rM-CSF (20 ng/ml) during 24 h. **B**, Cells at different days after the start of differentiation were starved for 18 h in the presence of T1317 or vehicle (DMSO) and then stimulated with L-cell cm (15% v/v) for 24 h. Cells from day 5 of differentiation were preincubated with LXR agonists or vehicle (DMSO) before addition of 5% GM-CSF-containing medium (**C**) or recombinant murine IL-3 (5 ng/ml) (**D**). **E**, Quiescent primary microglia (10^5 cells/well) were treated with L-cell cm (15% v/v) in the presence or absence of LXR agonists T1317 or GW3965 (1 μM). [3 H]thymidine was added during the last 6 h of treatment, and cell proliferation was measured in triplicate. ** $p < 0.01$ versus treatment with L-cell cm. **F**, Quiescent macrophages (5×10^4 cells/well) were treated with T1317 (1 μM) at different times before (-) or after (+) the stimulation with rM-CSF (10 ng/ml). Positive control cells were incubated with rM-CSF in the presence of vehicle (DMSO). Starved cells were kept in M-CSF-free medium throughout the experiment. In **A-F**, [3 H]thymidine incorporation from triplicates was measured as an indication of cellular proliferation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus treatment with the proliferating agent, # $p < 0.01$ versus starved cells. **G**, Quiescent macrophages were treated with T1317 or vehicle for 10 h. The cells were then stimulated with rM-CSF during 24 h. Control cells (Starved) were kept in M-CSF-free medium during the

RNase H Minus, Point Mutant, and oligo(dT)₁₅ primer (Promega, Madison, WI). Quantitative real-time PCR was performed using the Power SYBR Green Reagent Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers were designed so that they recognized regions located in different exons separated by large introns (Table I). We also included internal controls (total RNA samples before reverse transcription) to verify that there was no amplification derived from contaminating DNA. In some experiments, the RNA samples were treated with RNase-free DNase (Takara, Shiga, Japan). Real-time monitoring of PCR amplification was performed using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Data were expressed as relative mRNA levels normalized to the expression values of the gene coding for the ribosomal protein L14 or the rRNA 18S.

Protein extraction and Western blot analysis

Cells were washed twice in cold PBS and lysed in lysis solution (1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM HEPES [pH 7.5], 250 mM NaCl, protease inhibitors, and 1 mM sodium orthovanadate). Cell lysates were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; GE Healthcare Europe, Munich, Germany). Membranes were blocked in 5% milk in TBST. To study the phosphorylation of ERK-1/2, we used mAbs anti-diphosphorylated ERK-1/2 (clone MAPK-YT; Sigma-Aldrich) and anti-total ERK-2 Abs from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Cyclin protein expression was measured with an anti-cyclin kit (Rockland, Gilbertsville, PA). Abs against CDK2 and CDK4 were purchased from Santa Cruz Biotechnology. To check for protein loading and transfer, we used anti-mouse α -tubulin (Invitrogen) or anti- β -actin (Sigma-Aldrich). The membranes were washed in TBST and incubated for 1 h with peroxidase-conjugated secondary Abs (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, U.K. and Sigma-Aldrich). ECL detection was performed (GE Healthcare Europe GmbH), and the membranes were exposed to x-ray films (Kodak, Rochester, NY).

JNK activity assay

JNK activity was measured as described (32). Briefly, cells were lysed with nuclear extract protocols and immunoprecipitated with protein A-Sepharose and anti-JNK-1 Ab. After several washes, the reaction was performed with 1 μ g GST-C-JUN (1-169; MBL International, Woburn, MA) as JNK substrate, 20 μ M ATP, and 1 μ Ci γ [³²P]-ATP. The samples were subjected to SDS-PAGE electrophoresis, and the gel was dried and exposed to x-ray films.

Small interfering RNA

We used small interfering RNA (siRNA) technology to block the induction of the cholesterol transporters *Abcg1* and *Abca1* (On Target Plus Smart Pool; Dharmacon, Lafayette, CO) or the transcription factor *Srebp-1c* (validated siMax siRNA NM_011480si.1; Eurofins MWG Operon). Control siRNAs were designed against luciferase (5'-CGTACGCGGAA-TACTTCGA-3') (purchased from Dharmacon). siRNAs were transfected into macrophages by electroporation as described (33). Briefly, macrophages (4×10^6 cells in 400 μ l DMEM) were mixed with 1.5 μ M siRNA in 4-mm gap cuvettes (BTX no. 640; Genotronics) and placed on ice for 15 min. Electroporation was carried out at 2300 μ F, 300 V, 13 Ω (~27 ms) with an ECM 600 electroporator (BTX). The samples were placed on ice for 20 min before reconstitution in DMEM/20% FCS/30% L-cell cm. Subsequent assays were carried out 24 h after transfection. The effectiveness of the siRNAs used in this study was checked by real-time PCR.

Results

BMDMs represent an appropriate cell model for the study of the molecular events that govern primary cell proliferation. In fact, macrophages were central to the identification of D-type cyclins and CDK4, and the first work showing that cell cycle proteins are the targets for antiproliferative agents was performed in macrophages (34). To study the capability of LXR agonists to modulate macrophage proliferation, we preincubated BMDMs with the synthetic LXR agonists T1317 or GW3965 before the treatment with the growth factor M-CSF (Fig. 1A). [³H]thymidine incorporation

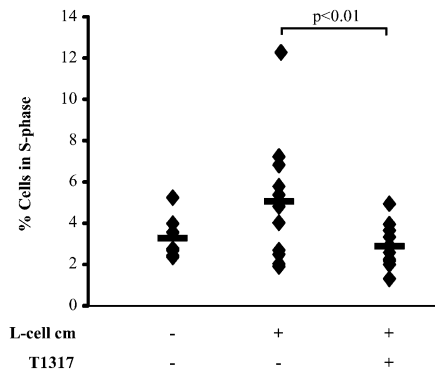


FIGURE 2. LXR activation inhibits macrophage proliferative responses in vivo. Peritoneal cells were obtained from a model of Con A-elicited peritonitis. After 3 d of Con A injection, 5% L-cell cm was injected as a source of murine M-CSF. Control mice were injected with DMEM alone. LXR activation was induced by two i.p. administrations of T1317 (10 mg/kg each). Macrophage populations (expressing F4/80) were gated, and their DNA content was determined by propidium iodide staining. The percentage of S phase cells for each group of animals is shown (diamonds). Mean values for each group are represented as horizontal bars. Control animals, $n = 7$; animals treated with L-cell cm alone, $n = 12$; T1317 and L-cell cm-treated mice, $n = 10$.

during DNA synthesis was measured as an indication of proliferation (31). In a dose-dependent manner, treatment with LXR ligands inhibited [³H]thymidine incorporation in response to M-CSF. The proliferative response of myeloid cells differentiating in vitro in response to M-CSF can be readily detected after 1 d of differentiation in vitro, with maximal levels of DNA synthesis between days 4 and 6 of in vitro differentiation (data not shown). In all stages of differentiation, LXR activation led to inhibition of cellular proliferation (Fig. 1B). Antiproliferative effects were also observed in cells from day 5 of differentiation stimulated with the cytokines GM-CSF or IL-3 in the presence of LXR ligands (Fig. 1C, 1D). Moreover, LXR agonists also inhibited proliferative responses in primary microglia, specialized macrophages in the CNS (Fig. 1E).

To understand the time requirements needed for LXR agonists to affect macrophage proliferation, we treated macrophages with the agonist T1317 at different times before and after the stimulation with M-CSF (Fig. 1F). Maximal growth arrest was observed when the cells were treated with the LXR agonist before the stimulation with M-CSF. Simultaneous treatment with the LXR ligand and the growth factor resulted in significant inhibition of proliferation. Similar results were obtained when the LXR ligand was added 2 h after the stimulation with M-CSF, whereas progressive loss of the antiproliferative effects were observed when the agonist was supplied at later time points. Cell cycle distribution studies showed that treatment with T1317 resulted in accumulation of cells in the G₀/G₁ phase, with inhibited transition to the S and G₂/M phases of the cell cycle (Fig. 1G).

To check whether LXR agonists exert antiproliferative actions on macrophages in vivo, we used a murine model of peritonitis induced by Con A. Macrophage proliferative responses were induced by i.p. injection of 5% L-cell cm. Peritoneal cells were stained with propidium iodide for flow cytometry analysis of DNA content. Cell cycle analysis was performed for the cellular

entire length of the experiment. The DNA content was determined by flow cytometry after propidium iodide staining. Mean values \pm SD of the percentage of cells at each phase of the cell cycle were calculated from triplicates. * $p < 0.05$ versus starved cells, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus M-CSF-treated cells. Similar results were obtained in two (B-G) or three (A) independent experiments.

population expressing the macrophage surface marker F4/80. An increase of the percentage of cells within the S phase of the cell cycle was observed as a response to *in vivo* injection of L-cell cm. Importantly, treatment with T1317 significantly reduced the percentage of cells in S phase (Fig. 2).

We further analyzed the contribution of LXR isoforms to the antiproliferative effects of LXR agonists in macrophages. BMDMs from wild-type (wT), LXR α -deficient, LXR β -deficient, or LXR α/β -deficient mice were incubated with LXR agonists and then stimulated with M-CSF at different concentrations (Fig. 3A). [3 H]thymidine incorporation assays indicated that the inhibitory effects of the LXR agonists were abolished in macrophages deficient for both LXR α and β , but not in single knockout macrophages, which suggests that both isoforms contribute to the growth arrest mediated by LXR agonists in these cells. These effects

were confirmed using cell-counting tests (Fig. 3B). We have previously described that immune cell activating factors, such as LPS and IFN- γ , result in macrophage growth arrest (35). In our hands, such activating factors inhibited proliferation in both wT and LXR-deficient macrophages (Fig. 3C), thus indicating that macrophages deficient in LXRs have not lost the capability to undergo growth arrest in response to proinflammatory signals.

We next evaluated whether signaling by M-CSF exerted reciprocal negative effects on either expression of LXR isoforms or the induction of LXR target genes (Fig. 4, Supplemental Fig. 1). The expression of *Lxr* α and β , as well as of their heterodimeric partners *Rxr* α and β , was indeed upregulated during the process of macrophage differentiation in response to M-CSF (Fig. 4A, Table I). No expression of *Rxr* γ was detected in these cells (data not shown). In differentiated macrophages, the presence of M-CSF

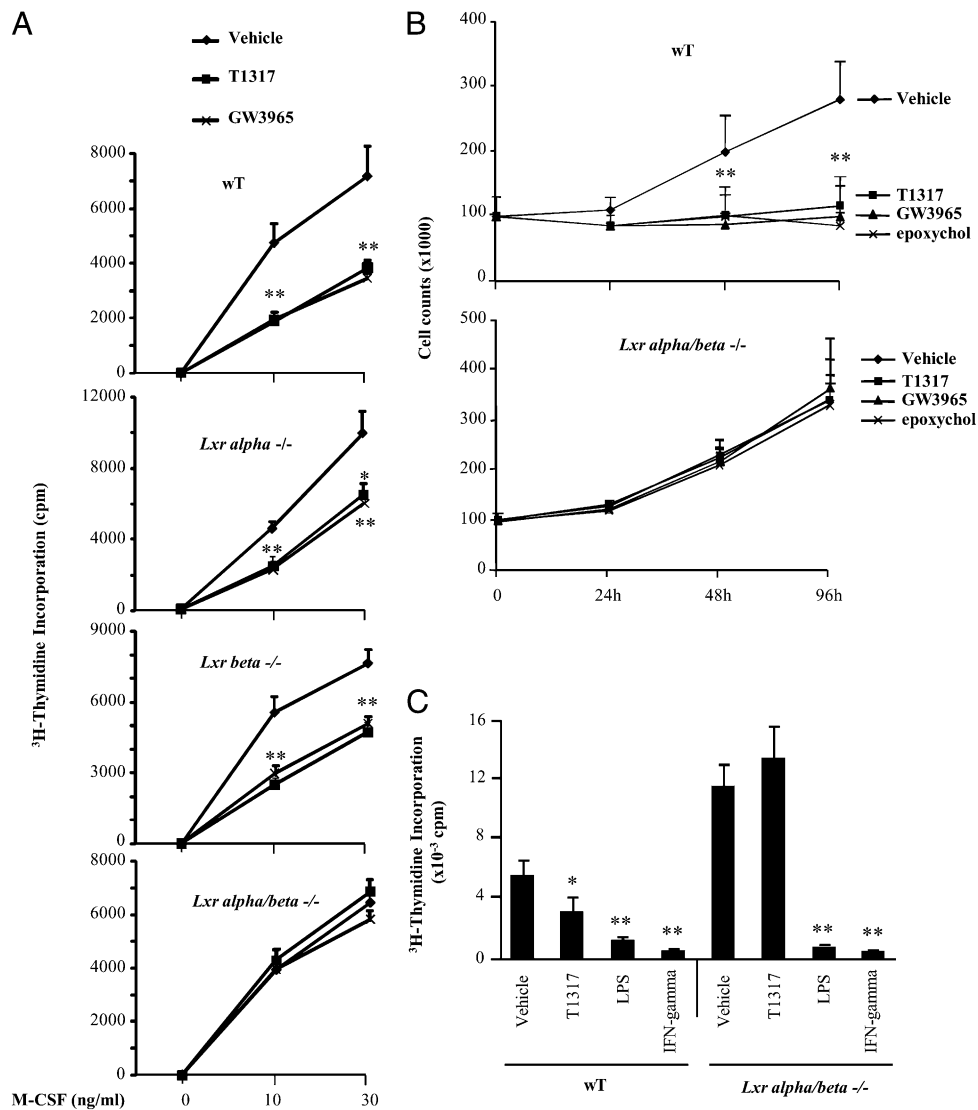


FIGURE 3. LXR α and β contribute to the antiproliferative effects of LXR agonists in macrophages. *A*, Quiescent wT, LXR α -deficient (*Lxr* α ^{-/-}), LXR β -deficient (*Lxr* β ^{-/-}), and LXR α/β -deficient (*Lxr* α/β ^{-/-}) macrophages (4×10^4 cells/well) were incubated with T1317 or GW3965 (1 μ M) during 18 h and then stimulated with different concentrations of rM-CSF (24 h). [3 H]thymidine incorporation was used as a measurement of cell proliferation. Mean values from triplicates are represented. *B*, Cell counts were performed using wT (*upper panel*) and LXR-deficient (*Lxr* α/β ^{-/-}) (*lower panel*) macrophages. The cells (10^5 cells/well) were grown in L-cell cm (30% v/v) during 4 d in the presence of either DMSO (control cells) or LXR agonists T1317, GW3965 (1 μ M each), or 24,25-epoxycholesterol (epoxychol; 10 μ M). Fresh agonists were added to the cells every day. Total cell counts were determined by trypan blue exclusion at the indicated time intervals. Triplicates from each condition were used to determine the mean \pm SD. ** $p < 0.01$ versus treatment with L-cell cm. *C*, Quiescent wT and LXR-deficient (*Lxr* α/β ^{-/-}) macrophages (4×10^4 cells/well) were incubated with LPS (100 ng/ml), IFN- γ (10 ng/ml), or T1317 (1 μ M) during 18 h and then stimulated with rM-CSF (10 ng/ml) for 24 h. Cell proliferation was measured by [3 H]thymidine incorporation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus M-CSF treatment. The data are representative of two (*B*) or three (*A*, *C*) independent experiments.

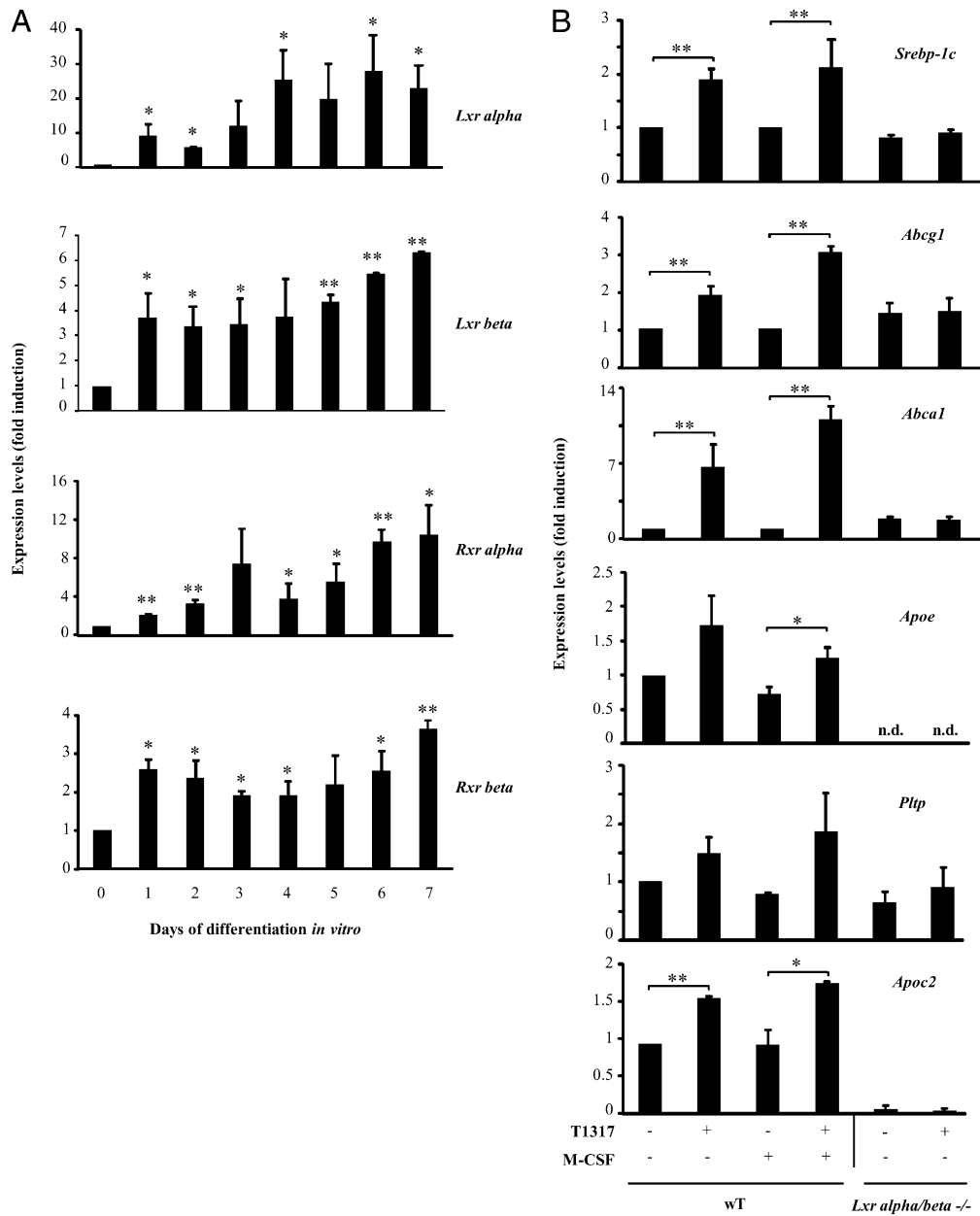


FIGURE 4. M-CSF does not interfere with LXR activation or the basal expression of LXR target genes. *A*, Bone marrow cells were differentiated in vitro in macrophage-differentiating media. The cells were obtained sequentially after each day of differentiation. The expression of *Lxr* and *Rxr* isoforms was determined by quantitative real-time PCR. Gene expression values were normalized to the expression levels of *18S*. Fold induction levels were calculated using as a reference the levels of expression of each gene at day 0 (immediately after the extraction of the bone marrows). *B*, Starved differentiated wT macrophages were incubated for 24 h in the presence or absence of rM-CSF (30 ng/ml) and then stimulated with T1317 (1 μ M) or vehicle for 18 h. As a negative control of LXR activation, starved LXR α/β -deficient macrophages were incubated with vehicle or T1317. The expression of LXR target genes was evaluated by quantitative real-time PCR and normalized to the expression levels of *L14*. Fold induction values were calculated using the expression levels of starved wT cells as a reference. The graphics show mean levels \pm SEM from two (*A*) or three (*B*) independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus cells from day 0 (*A*) or control cells without agonist (*B*). n.d., nondetectable levels.

did not inhibit basal expression or the induction of LXR target genes, including the cholesterol transporters *Abca1* and *Abcg1*, the transcription factor *Srebp-1c*, *ApoE*, and CII (*Apoc2*), and phospholipid transfer protein (*Pltp*) (Fig. 4*B*). These results suggest that M-CSF signaling does not reciprocally exert negative interference on LXR activation.

Nuclear receptor activation has been shown to affect the activity of members of the MAPK family (32, 36). Signaling through the MAPKs ERK-1 and -2 is required for macrophage proliferation in response to M-CSF (9, 24). For this reason, we tested whether LXR agonists affect ERK activity during the macrophage response

to M-CSF. Treatment with the growth factor led to increased phosphorylation of ERK-1/2 on both the cytoplasm and nucleus; however, we did not observe decreased ERK activity in the presence of LXR ligands (Fig. 5*A*). No inhibition of JNK activity was detected either at the doses used in these experiments (Fig. 5*B*), which suggests that the mechanism of action that accounts for LXR-mediated macrophage growth arrest is not related to decreased activity of these early signaling cascades. These observations are in agreement with the capability of T1317 to still lead to significant macrophage growth arrest even when it is supplied 2 h after the treatment with M-CSF (Fig. 1*E*). We also considered

Table I. Primers used for real time-PCR analysis

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<i>18S</i>	5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
<i>Abca1</i>	5'-GCGAGGGTCATGACAT-3'	5'-GAAGCGGTCTCCCAAAC-3'
<i>Abcg1</i>	5'-TCACCCAGTTCTGCATCCTT-3'	5'-GCAGATGTGTGTCAGGACCGAGT-3'
<i>Apoc2</i>	5'-ACCTGTACCAGAAGACATACCC-3'	5'-GTA AAAAATGCCTGCGTAAGTGC-3'
<i>ApoE</i>	5'-CTGACAGGATGCCTAGCCG-3'	5'-CGCAGGTAATCCCAAGA-3'
<i>Cdk2</i>	5'-AGTGGCTGCATCACAAGGA-3'	5'-CAAGCTCCGTCCATCTTCAT-3'
<i>Cdk4</i>	5'-TGGAGCGTTGGCTGTATCTTT-3'	5'-TGGAGGCAATCCAATGAGATC-3'
<i>Ccnb1</i>	5'-AAGTGCCTGTGTGAACC-3'	5'-GTCAGCCCCATCATCTGCG-3'
<i>Ccnd1</i>	5'-GCGTACCCTGACACCAATCTC-3'	5'-CTCCTCTTCGCACTTCTGCTC-3'
<i>Hprt</i>	5'-ATCATTATGCCGAGGATTTGG-3'	5'-GCAAAGA ACTTATAGCCCC-3'
<i>L14</i>	5'-TCCAGGCTGTTAACGCGGT-3'	5'-GCGCTGGCTGAATGCTCTG-3'
<i>Lxr α</i>	5'-CCTTCCTCAAGGACTTCAGTTACAA-3'	5'-CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT-3'
<i>Lxr β</i>	5'-CATTCGACTCCAGGACAAGA-3'	5'-CCCAGATCTCGGACAGCAAG-3'
<i>Pltp</i>	5'-CGCAAAGGGCCACTTTTACTA-3'	5'-GCCCCATCATATAAGAACCAG-3'
<i>Skp2</i>	5'-AAACCTTTGTGGGTGCTCTG-3'	5'-TGGGTGATGGTGTGGTAA-3'
<i>Srebp-1c</i>	5'-AGGCCATCGACTACATCCG-3'	5'-ATCCATAGACACATCTGTGCCTC-3'
<i>Rxr α</i>	5'-TAGTCGCAGACATGGACACC-3'	5'-GTTGGAGAGTTGAGGGACGA-3'
<i>Rxr β</i>	5'-GCACAGAACTCAGCCCAT-3'	5'-CATCCTCATGTCACGCATTT-3'
<i>Rxr γ</i>	5'-GCCTGGGATTGGAAATATGA-3'	5'-ACACCGTAGTGCTCCCTGA-3'

Hprt, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase.

the possibility that regulation of the apoptosis inhibitory factor AIM/SP α could, in an autocrine manner, play a role in mediating the antiproliferative actions described in this study. AIM/SP α is a member of the scavenger receptor cystein-rich superfamily that is upregulated by LXR agonists in macrophages (18, 19). In combination with TGF- β , AIM/SP α mediates growth inhibition of B lymphocytes (37). We overexpressed murine AIM in human embryonic kidney 293 cells and used the supernatants to assess their effect on the proliferation of BMDMs. Control supernatants were obtained from cells transfected with an empty vector. In our hands, no inhibition in the proliferation rate of macrophages was observed (Fig. 5C), although the supernatant containing AIM did increase macrophage survival in response to growth factor withdrawal, as indicated by the analysis of the percentage of sub-G₀/G₁ nuclei by flow cytometry (Fig. 5D). These observations suggest that autocrine production of AIM is unlikely to account for the LXR-mediated inhibition of macrophage proliferation.

We further characterized changes in the expression of molecules involved in the regulation of the cell cycle. The expression of several cyclins and CDKs was upregulated by M-CSF, as analyzed by Western blotting (Fig. 6A). Interestingly, LXR activation led to decreased protein expression of CCND1 and -B1 and of CDK2 and -4 (Fig. 6A). We also observed inhibitory effects of the LXR agonist on the mRNA expression of *Ccnb1* at prolonged times of M-CSF treatment, but the mRNA expression of *Ccnd1*, *Cdk2*, or *Cdk4* (Fig. 6B, Supplemental Fig. 1C) was not significantly inhibited, which suggests that downregulation of these molecules is not a general result of direct LXR-mediated transrepression of their genes. Previous work described by other investigators in vascular smooth muscle cells and prostate cancer cells suggested a role for LXR in the regulation of the expression of S phase kinase-associated protein 2 (SKP2) (21, 38), a protein involved in cellular degradation of the cell cycle inhibitor p27KIP1 (39). In our hands, we have not observed changes in the expression of *Skp2* mRNA levels in response to LXR activation in macrophages (Fig. 6C, Supplemental Fig. 1D), and LXR agonists exerted antiproliferative effects in p27KIP1-deficient macrophages (Fig. 6D), which suggests that the effects mediated by LXRs on macrophage cyclin/CDK protein levels and proliferation are independent of p27KIP1. Similar results were obtained in macrophages deficient for p21WAF (Fig. 6E).

Recent findings indicated that upregulation of the cholesterol transporter ABCG1 by LXR agonists limit the mitogen-driven expansion of T lymphocytes (20). The authors hypothesized that changes in the intracellular compartmentalization of sterols could probably be sensed by components of the cell-cycle machinery. As a consequence, conditions in which sterols are not readily available in a specific compartment could be interpreted by the cell as a nonappropriate metabolic condition for cell division. We analyzed whether alterations in the expression of key molecules involved in macrophage cholesterol homeostasis affected the capability of LXR agonists to inhibit macrophage proliferation. We used siRNA to downregulate the LXR-mediated induction of *Abcg1* (Supplemental Fig. 2A). However, we did not observe changes in the capability of T1317 or GW3965 to inhibit macrophage proliferation in response to M-CSF (Fig. 7A). The use of macrophages derived from ABCG1-deficient mice confirmed these results (Fig. 7B). Interestingly, ABCG1-deficient macrophages showed increased levels of proliferation in response to M-CSF, but activation of the LXR pathway still led to significant inhibition of macrophage proliferation in these cells. We also tested the role of ABCA1 by using either macrophages deficient for this protein (Fig. 7C) or siRNA technology (Fig. 7D, Supplemental Fig. 2B). Similarly to ABCG1-deficient cells, macrophages with deficient expression of ABCA1 showed higher proliferative rates, but LXR activation inhibited their proliferation. To simultaneously inhibit the expression of both ABCA1 and ABCG1 cholesterol transporters, we used siRNA against *Abca1* in ABCG1-deficient cells (Fig. 7D). Again, the capability of LXR agonists to inhibit macrophage proliferation was not blocked, and similar results were obtained when the ABCG1-deficient cells were treated with the ABCA1 inhibitor probucol (Fig. 7E). Finally, interference with the expression of two other LXR target genes with important roles in lipid homeostasis, namely *ApoE* (by using APOE-deficient macrophages) (Fig. 7F) or *Srebp-1c* (via siRNA technology) (Fig. 7G, Supplemental Fig. 2C), did not affect the antiproliferative actions of LXR agonists in macrophages. Taken together, our data suggest that macrophages have a higher capability to proliferate in conditions that lead to reduced ABCA1 or ABCG1 expression, maybe due to intracellular cholesterol accumulation or important changes in intracellular cholesterol distribution. However, LXR agonists still have the capability to inhibit macrophage proliferation in these settings, which suggests

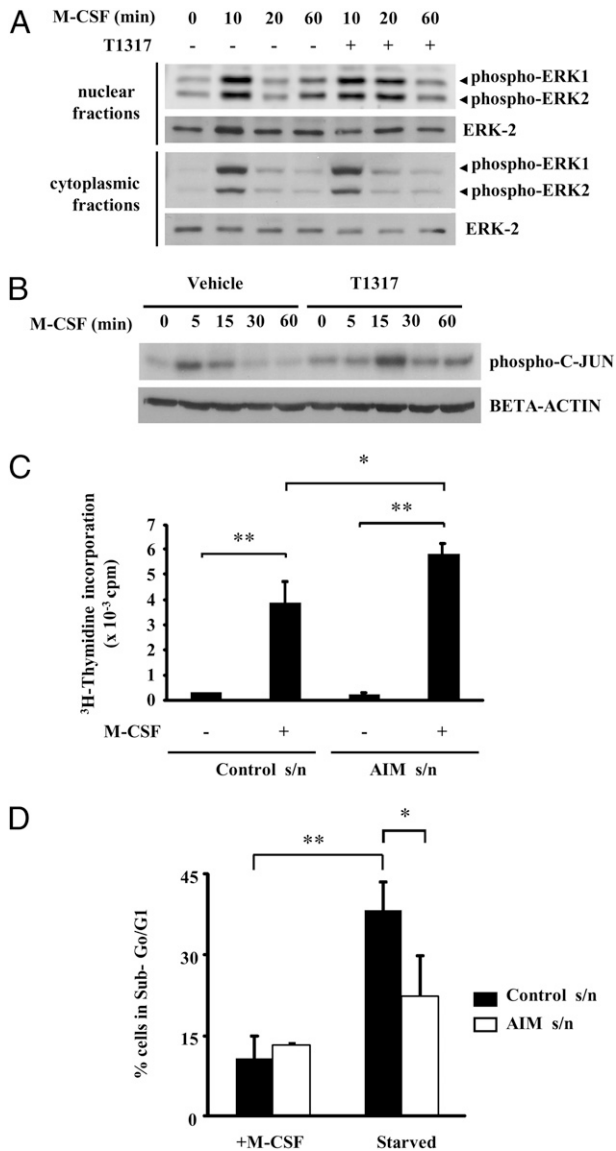


FIGURE 5. LXR activation inhibits macrophage proliferation without affecting ERK activation. *A* and *B*, Quiescent macrophages were incubated with rM-CSF for different periods of time in the presence of either vehicle or T1317. In *A*, ERK activation was determined by Western blotting using anti-diphosphorylated ERK-1/2. Total ERK-2 was determined as a control. In *B*, JNK activity was measured by an *in vitro* kinase assay using GST-C-JUN as a substrate. The amount of β -actin was analyzed by Western blotting as a control of total protein levels. Three independent experiments were performed in *A* and *B*. *C*, Quiescent macrophages were treated for 18 h with control supernatant from HEK-293 EBNA cells or supernatant containing rAIM and then stimulated with rM-CSF. The graphic shows mean values of [3 H]thymidine incorporation \pm SD calculated from triplicates. *D*, Macrophages were either starved (without M-CSF) or treated with rM-CSF (20 ng/ml) for 36 h in the presence of control supernatant from HEK-293 EBNA cells or supernatant containing rAIM. The percentage of dead cells with sub- G_0/G_1 DNA content was determined from triplicates by flow cytometry. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

that the LXR pathway affects macrophage cyclin expression and proliferation independently of the changes in cholesterol trafficking caused by the induction of ABCA1 or G1.

Discussion

The combination of anti-inflammatory and prosurvival effects suggests that the LXR pathway may have evolved as a means to

potentiate the role of the macrophage in resolution of inflammation. In this work, we have shown that LXR agonists, in a dose-dependent and LXR-specific manner, are capable of limiting the expansion of macrophages and their progenitor cells in response to M-CSF. Recent work demonstrated that activation of the LXR pathway takes place after phagocytosis of apoptotic bodies (40), and apoptotic uptake is known to inhibit the proliferation of macrophages in response to M-CSF (41), which raises the question of whether this effect is mediated through production of LXR ligands.

LXR agonists have been demonstrated to exert antiproliferative actions in other cellular systems as well, including vascular smooth muscle cells (21), prostate (38), and breast (22) cancer cells, T lymphocytes (20), and pancreatic islet β cells (42). While this work was under revision, Kim et al. (43) also demonstrated antiproliferative effects of LXR agonists in several other cell lines, including human THP-1 macrophages. Our results indicate that both LXR α and β isoforms participate in the antiproliferative actions of LXR agonists in macrophages. In the absence of both isoforms, macrophages show an increased proliferative response to M-CSF, and the inhibitory capability of synthetic LXR agonists is abolished. Increased proliferation of glial cells has been also observed in the brains of LXR α/β -deficient mice (44). These observations contrast with the specific requirement of LXR β for the inhibition of mitogen- and Ag-driven expansion of T lymphocytes mediated by oxysterols (20), which may be a consequence of LXR β playing a more predominant role than LXR α in T cells.

The antiproliferative effects of the LXR pathway in BMDMs correlate with inhibitory effects on the protein expression levels of selected cyclins and CDKs. In particular, we have observed reduced protein expression of CCND1 and -B1 and of CDK2 and -4, although we cannot discard that other cyclins and CDKs not tested in this study are also affected. Downregulation of CCND1, CDK2, and CDK4 correlates with the fact that macrophages treated with LXR agonists predominantly accumulate in the G_1 phase of the cell cycle. LXR activation only affected protein expression of these molecules without downregulating their mRNA levels, which suggests that, in contrast to the effects of LXR agonists on pro-inflammatory gene expression, inhibition of CCND1, CDK2, and CDK4 expression is not mediated by direct transrepression of the genes encoding these proteins. Interestingly, expression of CCNB1, which acts later during the cell cycle (45), was affected both at the protein and mRNA levels. We cannot discard, though, that the actions on CCNB1 expression are secondary effects resulting from abnormal progression through the S phase of the cell cycle. LXR activation leads to changes in cyclin expression in other cellular models as well. For example, in vascular smooth muscle cells and human breast cancer cells, CCNA and -D1 were affected (21, 22), whereas changes in CCNE1 and -E2 were reported in T cells (20). The reason why there is variability in the type of cyclins affected by LXR agonists in different cellular systems has not been determined. However, one point in common is that most of the studies showed an arrest of cells within the G_1 phase of the cell cycle. Interestingly, some of the reports on the antiproliferative actions of LXRs also showed stabilization of the cell cycle inhibitor p27KIP1, which was mediated through suppression of the expression of SKP2, an F-box protein that targets p27KIP1 for degradation (38, 46). However, our experiments using cells derived from p27KIP1-deficient mice do not support a role for this protein in limiting the proliferation of macrophages in response to LXR ligands. In accordance with our observations, LXR agonists inhibited the proliferation of specific human breast cancer cell lines (22) and of IL-2-stimulated T cell blasts (47) without altering the levels of p27KIP1. Moreover, most of the studies

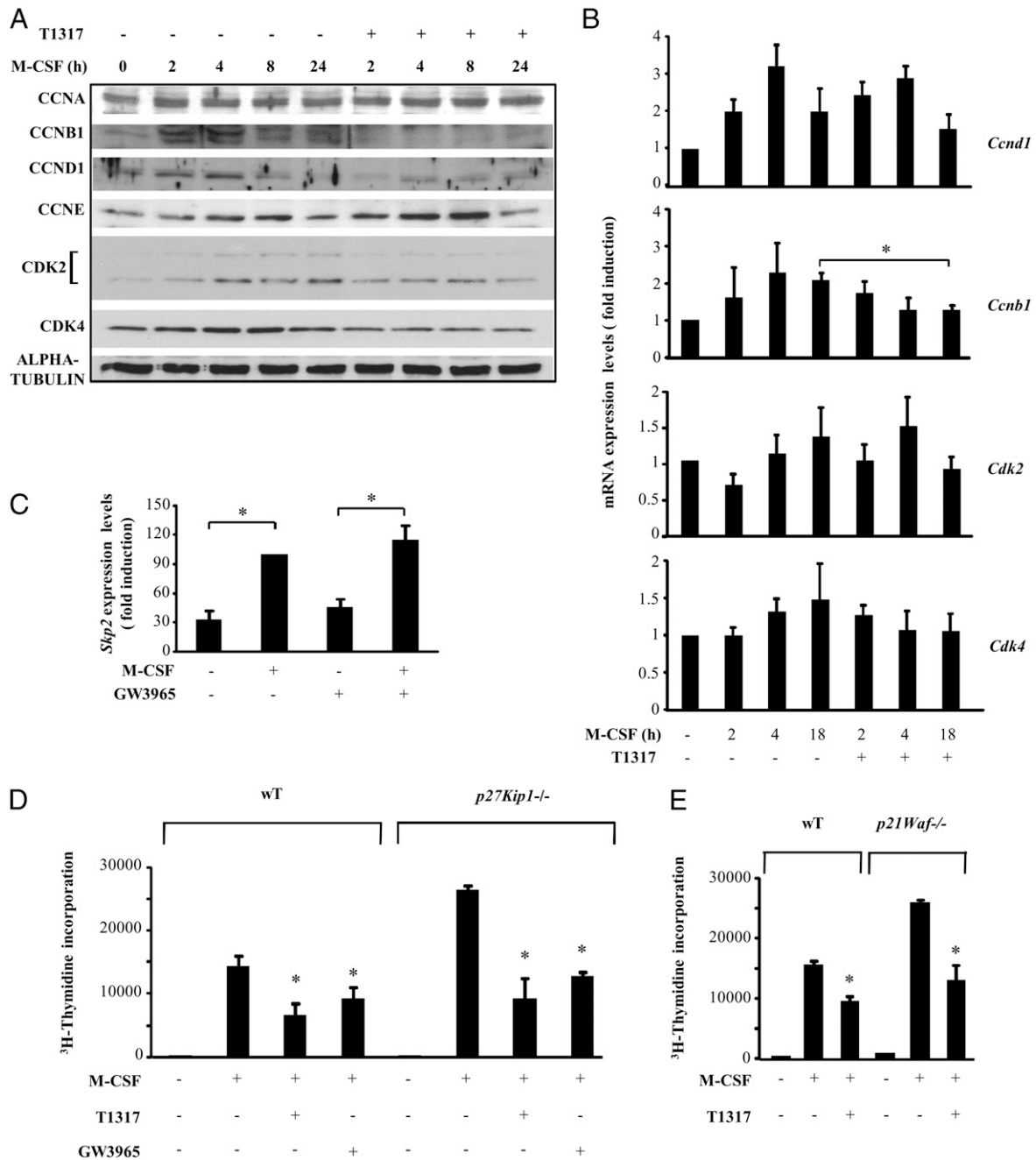


FIGURE 6. The protein expression levels of CCND1 and -B1 and CDK2 and -4 are downregulated upon LXR activation. *A*, Quiescent macrophages were incubated with rM-CSF (20 ng/ml) for the indicated periods of time in the presence or absence of T1317 (1 μM). The expression of several cyclins and CDKs was assessed by Western blotting using specific Abs. Equivalent results were observed in four independent experiments. *B*, Real time-PCR analysis of the mRNA levels of *CcnD1* and -*B1* and *Cdk2* and -*4*. The relative expression levels of each gene were normalized to *L14* expression levels and graphed as fold induction ± SEM from three independent experiments. *C*, Macrophages were prestimulated with GW3965 or vehicle and then treated with rM-CSF (20 ng/ml) for 6 h. The graph shows mean fold induction levels of *Skp2* mRNA expression ± SEM from three independent experiments. In *B* and *C*, **p* < 0.01. *D*, LXR agonists inhibit macrophage proliferation in a p27KIP1-independent manner. Quiescent macrophages derived from wT or p27KIP1-deficient mice (*p27Kip1*^{-/-}) were treated with rM-CSF (20 ng/ml) in the presence of T1317 (1 μM), GW3965 (1 μM), or vehicle (DMSO). *E*, Macrophages derived from wT or p21WAF-deficient mice (*p21Waf*^{-/-}) were treated with rM-CSF (20 ng/ml) in the presence of T1317 (1 μM) or vehicle (DMSO). In *D* and *E*, [³H]thymidine incorporation was used as a measurement of cell proliferation. Mean values ± SD were calculated from two biological experiments each performed in triplicate. **p* < 0.01 versus M-CSF treatment.

showing effects of LXR agonists on p27KIP1 protein levels are based on experiments performed with high doses of these agonists (up to 10 times superior to the maximal doses used in our experimental conditions) (42, 46), and no demonstration is included of whether these effects are LXR specific or not.

Another main point of discussion is whether changes in cholesterol redistribution play an antiproliferative role in macro-

phages. Bensinger et al. (20) elegantly showed that T cell proliferation correlated with increased expression of the sulfotransferase SULT2B1, an enzyme that transfers sulfate groups to oxysterols, thus inactivating them as LXR ligands and facilitating their export from the cell. As a consequence, expression of the LXR target genes *Abca1* and *Abcg1* was downregulated during T cell proliferation. Based on the requirement of intracellular

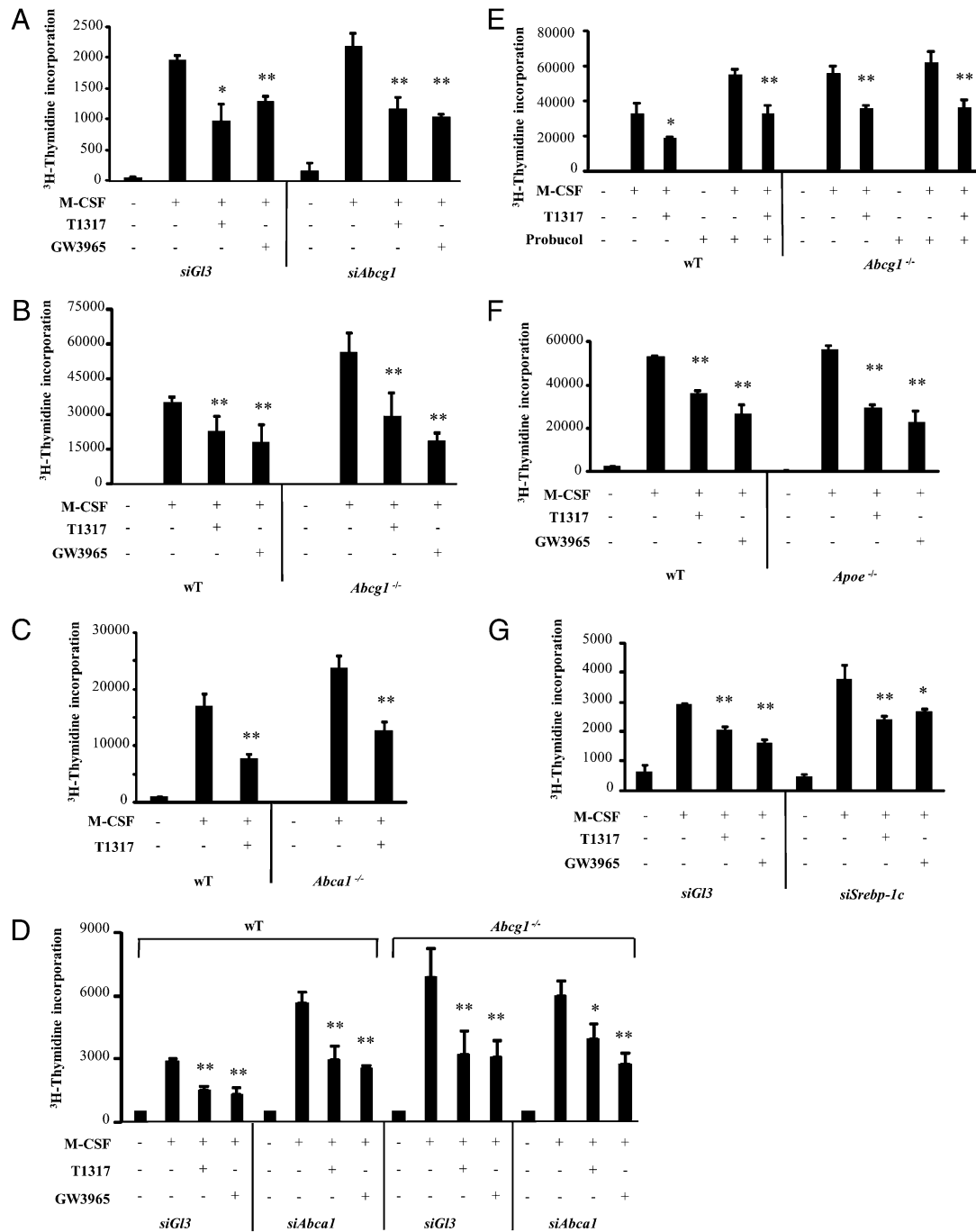


FIGURE 7. LXR agonists inhibit macrophage proliferation in the absence of functional ABCG1 or ABCA1 expression. Macrophages from different sources (see below) were treated with rM-CSF (20 ng/ml) in the presence or absence of 1 μ M T1317 or GW3965. Control cells were treated with vehicle (DMSO). Proliferation was determined by [³H]thymidine incorporation. **A**, Macrophages were previously transfected with siRNA against *Abcg1* (*siAbcg1*) or luciferase (*siG13*). Similar results were obtained in four independent experiments. **B**, Macrophages were obtained from wT or ABCG1-deficient mice (*Abcg1*^{-/-}). **C**, Macrophages were obtained from wT or ABCA1-deficient mice (*Abca1*^{-/-}). **D**, Macrophages derived from wT or ABCG1^{-/-} mice were transfected with siRNA against *Abca1* (*siAbca1*) or luciferase (*siG13*). **E**, Macrophages from wT or *Abcg1*^{-/-} mice were treated with rM-CSF in the presence or absence of T1317 and/or probucol (20 μ M). **F**, Macrophages were obtained from wT or *ApoE*^{-/-} mice. **G**, Macrophages were transfected with siRNA against *Srebp-1c* (*siSrebp-1c*) or luciferase (*siG13*). In **B–G**, similar results were obtained in duplicate experiments, each performed in triplicate. In all proliferation tests, * p < 0.05, ** p < 0.01 versus the corresponding M-CSF treatment.

cholesterol for mitosis (48), reduced expression of the cholesterol transporter ABCG1 was proposed to affect the intracellular distribution of cholesterol and represent a strategy for T cells to ensure adequate progression through the cell cycle. Independent groups have indeed reported proliferative advantages in ABCG1 null lymphocytes (20, 49) and in human prostate cancer cells with knockdown expression of ABCA1 (50). In our studies, macro-

phages with deficient expression of ABCA1 or ABCG1 did show higher proliferation levels compared with control cells, which supports the idea that increased availability of intracellular cholesterol favors proliferative responses. However, M-CSF signaling did not negatively interfere with basal or agonist-induced expression of LXR targets involved in macrophage lipid metabolism, including ABCA1 and ABCG1, which suggests that macrophage

proliferation in response to M-CSF, in contrast to mitogen-driven T cell expansion, does not require downregulation of LXR-dependent pathways. In support of this observation, gene profiling studies performed in human macrophages treated with M-CSF revealed enrichment of gene expression programs involved in lipid metabolism (51). Moreover, the antiproliferative effects of LXR agonists on macrophage proliferation were not abolished in macrophages with reduced expression of ABCA1 or ABCG1. The complex nature of macrophage cholesterol homeostasis may help explain these differences between macrophages and T cells. A recent study comparing different cell lines proposed a close correlation between LXR-mediated cell cycle arrest and lipogenic gene expression and triacylglyceride accumulation (43). In our hands, however, the use of siRNA to downregulate *Srebp-1c* expression did not counteract the antiproliferative role of LXRs in macrophages, in line with results obtained in human breast cancer cells (22).

Macrophage proliferation has been associated with the pathogenesis of certain diseases. For example, proliferation of macrophage-derived foam cells is critical in the evolution of atherosclerotic lesions (52); in glomerulonephritic disease, macrophage proliferation is largely associated to areas of severe renal damage (53); and in the CNS, several pathological states lead to the appearance of proliferating brain macrophages (54). Cytokines present at inflammatory sites, such as M-CSF and GM-CSF, may be responsible for these proliferative responses. We have shown in this work that LXR activation inhibits macrophage proliferation induced by these cytokines. Our observations in a model of peritonitis in vivo strengthen the hypothesis that activation of LXRs might provide a mechanism to limit macrophage proliferation within inflammatory lesions and potentiate the role of these cells in resolution of inflammation.

Acknowledgments

We thank Dr. David Mangelsdorf (University of Texas Southwestern, Dallas, TX) for kindly providing the LXR-deficient mice, Dr. Joan Carles Escolà-Gil (Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain) for APOE- and ABCA1-deficient mice, and Dr. Manuel Serrano (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain) for the *p27Kip* knockout mice. We thank the Flow Cytometry Core at Parc Científic de Barcelona for help with cell cycle analysis. We also thank Elvira Bailón, Helena Cornellà, Ainhoa Balaguer, and Lourdes Gibanel for technical support.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Gordon, S. 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37 (Suppl 1): S9–S17.
- Pennings, M., I. Meurs, D. Ye, R. Out, M. Hoekstra, T. J. C. Van Berkel, and M. Van Eck. 2006. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Lett.* 580: 5588–5596.
- Xaus, J., M. Comalada, A. F. Valledor, M. Cardó, C. Herrero, C. Soler, J. Lloberas, and A. Celada. 2001. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* 204: 543–550.
- Chitu, V., and E. R. Stanley. 2006. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 18: 39–48.
- Becker, S., M. K. Warren, and S. Haskill. 1987. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J. Immunol.* 139: 3703–3709.
- Comalada, M., J. Xaus, E. Sánchez, A. F. Valledor, and A. Celada. 2004. Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur. J. Immunol.* 34: 2257–2267.
- Yeung, Y. G., and E. R. Stanley. 2003. Proteomic approaches to the analysis of early events in colony-stimulating factor-1 signal transduction. *Mol. Cell. Proteomics* 2: 1143–1155.
- Bourette, R. P., and L. R. Rohrschneider. 2000. Early events in M-CSF receptor signaling. *Growth Factors* 17: 155–166.
- Valledor, A. F., J. Xaus, L. Marqués, and A. Celada. 1999. Macrophage colony-stimulating factor induces the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 through a protein kinase C-dependent pathway. *J. Immunol.* 163: 2452–2462.
- Roussel, M. F. 1997. Regulation of cell cycle entry and G1 progression by CSF-1. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 11–18.
- Nurse, P. 2002. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *ChemBioChem* 3: 596–603.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umeson, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835–839.
- Janowski, B. A., M. J. Grogan, S. A. Jones, G. B. Wisely, S. A. Kliewer, E. J. Corey, and D. J. Mangelsdorf. 1999. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 266–271.
- Willy, P. J., K. Umeson, E. S. Ong, R. M. Evans, R. A. Heyman, and D. J. Mangelsdorf. 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9: 1033–1045.
- Zelcer, N., and P. Tontonoz. 2006. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* 116: 607–614.
- Joseph, S. B., A. Castrillo, B. A. Laffitte, D. J. Mangelsdorf, and P. Tontonoz. 2003. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* 9: 213–219.
- Ghisletti, S., W. Huang, S. Ogawa, G. Pascual, M. E. Lin, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 2007. Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* 25: 57–70.
- Joseph, S. B., M. N. Bradley, A. Castrillo, K. W. Bruhn, P. A. Mak, L. Pei, J. Hogenesch, R. M. O'connell, G. Cheng, E. Saez, et al. 2004. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* 119: 299–309.
- Valledor, A. F., L. C. Hsu, S. Ogawa, D. Sawka-Verhelle, M. Karin, and C. K. Glass. 2004. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17813–17818.
- Bensinger, S. J., M. N. Bradley, S. B. Joseph, N. Zelcer, E. M. Janssen, M. A. Hausner, R. Shih, J. S. Parks, P. A. Edwards, B. D. Jamieson, and P. Tontonoz. 2008. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 134: 97–111.
- Blaschke, F., O. Leppanen, Y. Takata, E. Caglayan, J. Liu, M. C. Fishbein, K. Kappert, K. I. Nakayama, A. R. Collins, E. Fleck, et al. 2004. Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circ. Res.* 95: e110–e123.
- Vedin, L. L., S. A. Lewandowski, P. Parini, J. A. Gustafsson, and K. R. Steffensen. 2009. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30: 575–579.
- Gordon, D., M. A. Reidy, E. P. Benditt, and S. M. Schwartz. 1990. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4600–4604.
- Valledor, A. F., M. Comalada, J. Xaus, and A. Celada. 2000. The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *J. Biol. Chem.* 275: 7403–7409.
- Saura, J., E. Angulo, A. Ejarque, V. Casadó, J. M. Tusell, R. Moratalla, J. F. Chen, M. A. Schwarzschild, C. Lluís, R. Franco, and J. Serratos. 2005. Adenosine A2A receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. *J. Neurochem.* 95: 919–929.
- Sarrias, M. R., O. Padilla, Y. Monreal, M. Carrascal, J. Abian, J. Vives, J. Yélamos, and F. Lozano. 2004. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpa. *Tissue Antigens* 63: 335–344.
- Repa, J. J., S. D. Turley, J. A. Lobaccaro, J. Medina, L. Li, K. Lustig, B. Shan, R. A. Heyman, J. M. Dietschy, and D. J. Mangelsdorf. 2000. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289: 1524–1529.
- Peet, D. J., S. D. Turley, W. Ma, B. A. Janowski, J. M. Lobaccaro, R. E. Hammer, and D. J. Mangelsdorf. 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93: 693–704.
- Fero, M. L., M. Rivkin, M. Tash, P. Porter, C. E. Carow, E. Firpo, K. Polyak, L. H. Tsai, V. Broudy, R. M. Perlmutter, et al. 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27 (Kip1)-deficient mice. *Cell* 85: 733–744.
- Out, R., W. Jessup, W. Le Goff, M. Hoekstra, I. C. Gelissen, Y. Zhao, L. Kritharides, G. Chimini, J. Kuiper, M. J. Chapman, et al. 2008. Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circ. Res.* 102: 113–120.
- Celada, A., F. E. Borràs, C. Soler, J. Lloberas, M. Klemsz, C. van Beveren, S. McKecher, and R. A. Maki. 1996. The transcription factor PU.1 is involved in macrophage proliferation. *J. Exp. Med.* 184: 61–69.
- Díaz-Delfín, J., M. Morales, and C. Caelles. 2007. Hypoglycemic action of thiazolidinediones/peroxisome proliferator-activated receptor gamma by inhibition of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Diabetes* 56: 1865–1871.
- Valledor, A. F., L. Arpa, E. Sánchez-Tilló, M. Comalada, C. Casals, J. Xaus, C. Caelles, J. Lloberas, and A. Celada. 2008. IFN-gamma-mediated inhibition of MAPK phosphatase expression results in prolonged MAPK activity in response to M-CSF and inhibition of proliferation. *Blood* 112: 3274–3282.

34. Vadiveloo, P. K. 1999. Macrophages—proliferation, activation, and cell cycle proteins. *J. Leukoc. Biol.* 66: 579–582.
35. Xaus, J., M. Cardó, A. F. Valledor, C. Soler, J. Lloberas, and A. Celada. 1999. Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity* 11: 103–113.
36. Crisafulli, C., R. Di Paola, E. Mazzon, I. Paterniti, M. Galuppo, T. Genovese, P. Bramanti, A. Cappellani Ddagger, and S. Cuzzocrea. 2010. Liver X receptor agonist treatment reduced splanchnic ischemia and reperfusion injury. *J. Leukoc. Biol.* 87: 309–321.
37. Yusa, S., S. Ohnishi, T. Onodera, and T. Miyazaki. 1999. AIM, a murine apoptosis inhibitory factor, induces strong and sustained growth inhibition of B lymphocytes in combination with TGF-beta1. *Eur. J. Immunol.* 29: 1086–1093.
38. Chuu, C. P., J. M. Kokontis, R. A. Hiipakka, and S. Liao. 2007. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J. Biomed. Sci.* 14: 543–553.
39. Carrano, A. C., E. Eytan, A. Hershko, and M. Pagano. 1999. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.* 1: 193–199.
40. A-Gonzalez, N., S. J. Bensinger, C. Hong, S. Beceiro, M. N. Bradley, N. Zelcer, J. Deniz, C. Ramirez, M. Díaz, G. Gallardo, et al. 2009. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31: 245–258.
41. Reddy, S. M., K. H. Hsiao, V. E. Abernethy, H. Fan, A. Longacre, W. Lieberthal, J. Rauch, J. S. Koh, and J. S. Levine. 2002. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J. Immunol.* 169: 702–713.
42. Meng, Z. X., J. Nie, J. J. Ling, J. X. Sun, Y. X. Zhu, L. Gao, J. H. Lv, D. Y. Zhu, Y. J. Sun, and X. Han. 2009. Activation of liver X receptors inhibits pancreatic islet beta cell proliferation through cell cycle arrest. *Diabetologia* 52: 125–135.
43. Kim, K. H., G. Y. Lee, J. I. Kim, M. Ham, J. Won Lee, and J. B. Kim. 2010. Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *J. Lipid Res.* 51: 3425–3433.
44. Wang, L., G. U. Schuster, K. Hulthenby, Q. Zhang, S. Andersson, and J. A. Gustafsson. 2002. Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13878–13883.
45. Bassermann, F., C. Peschel, and J. Duyster. 2005. Mitotic entry: a matter of oscillating destruction. *Cell Cycle* 4: 1515–1517.
46. Fukuchi, J., J. M. Kokontis, R. A. Hiipakka, C. P. Chuu, and S. Liao. 2004. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64: 7686–7689.
47. Geyeregger, R., M. Shehata, M. Zeyda, F. W. Kiefer, K. M. Stuhlmeier, E. Porpaczy, G. J. Zlabinger, U. Jäger, and T. M. Stulnig. 2009. Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 86: 1039–1048.
48. Fernández, C., Mdel. V. Lobo Md, D. Gómez-Coronado, and M. A. Lasunción. 2004. Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation. *Exp. Cell Res.* 300: 109–120.
49. Armstrong, A. J., A. K. Gebre, J. S. Parks, and C. C. Hedrick. 2010. ATP-binding cassette transporter G1 negatively regulates thymocyte and peripheral lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 184: 173–183.
50. Fukuchi, J., R. A. Hiipakka, J. M. Kokontis, S. Hsu, A. L. Ko, M. L. Fitzgerald, and S. Liao. 2004. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64: 7682–7685.
51. El Chartouni, C., C. Benner, M. Eigner, M. Lichtinger, and M. Rehli. 2010. Transcriptional effects of Colony-stimulating factor-1 in mouse macrophages. *Immunobiology* 215: 466–474.
52. Rosenfeld, M. E., and R. Ross. 1990. Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 10: 680–687.
53. Yang, N., N. M. Isabel, D. J. Nikolic-Paterson, Y. Li, R. Ye, R. C. Atkins, and H. Y. Lan. 1998. Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 54: 143–151.
54. Perry, V. H., M. D. Bell, H. C. Brown, and M. K. Matyszak. 1995. Inflammation in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 636–641.

Biological Roles of Liver X Receptors in Immune Cells

Mónica Pascual-García · Annabel F. Valledor

Received: 2 November 2011 / Accepted: 16 March 2012
© L. Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wrocław, Poland 2012

Abstract Liver X receptors (LXRs) are members of the nuclear receptor superfamily that are activated by specific oxysterols. LXRs heterodimerize with retinoid X receptors to regulate positively the expression of a variety of target genes, many of which are involved in lipid and glucose metabolism. In the last few years, new targets of LXR activation have been identified with roles in the modulation of immune responses. Moreover, LXRs mediate repression of inflammatory pathways through mechanisms collectively known as transrepression. Here, we revise recent findings on the impact of LXR activation on immune responses, with an emphasis on advances in the understanding of the molecular mechanisms that mediate these effects.

Keywords LXR · Transrepression · Inflammation · Gene expression

Abbreviations

ABC	ATP-binding cassette transporter
AIM	Apoptosis inhibitory protein secreted by macrophages
AP-1	Activating protein-1
Apo	Apolipoprotein
Ccl	Chemokine (C–C motif) ligand
CCR7	CC chemokine receptor-7
ChREBP	Carbohydrate response element-binding protein
CORO2A	Coronin 2A
GPS2	G protein pathway suppressor 2

GR	Glucocorticoid receptor
HDAC	Histone deacetylase
HIV	Human immunodeficiency virus
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon-regulatory factor
LDL	Low-density lipoproteins
LPS	Lipopolysaccharide
LXR	Liver X receptor
LXRE	LXR response element
Mertk	c-mer tyrosine kinase
NCoR	Nuclear receptor co-repressor
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NOS2	Nitric oxide synthase 2
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RXR	Retinoid X receptor
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein 1c
STAT-1	Signal transducer and activator of transcription
SULT	Sulfotransferase
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
Th	Helper T cell
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor

M. Pascual-García · A. F. Valledor (✉)
Nuclear Receptor Group, Department of Physiology and Immunology, School of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal, 643, 3rd Floor, 08028 Barcelona, Spain
e-mail: afernandezvalledor@ub.edu

Introduction

Nuclear receptors are ligand-dependent transcription factors that modulate metabolism, development, proliferation and

inflammation through positive and negative regulation of gene expression (Mangelsdorf et al. 1995). Liver X receptors (LXRs) are members of the nuclear receptor superfamily that are activated by specific oxidized forms of cholesterol (oxysterols) and intermediate products of the cholesterol biosynthetic pathway (Janowski et al. 1999; Yang et al. 2006). Two LXR isoforms have been identified, namely LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2), encoded by separate genes. LXR α is expressed in liver, adipose tissue, kidney, intestine, spleen and macrophages, whereas LXR β is ubiquitously distributed. By forming heterodimers with retinoid X receptors (RXRs), LXRs bind to LXR response elements (LXRE) that usually follow the consensus sequence (G/T/A)G(G/T)T(C/T)Annnn(C/A/T)G(G/T)(T/G)CA (Edwards et al. 2002) in the promoter or enhancer elements of LXR target genes. Activation of LXR–RXR heterodimers induces the expression of a variety of target genes, many of which are involved in lipid and glucose metabolism. In the last few years, new targets of LXR activation have been identified with roles in the modulation of immune responses. Moreover, LXRs have been shown to mediate repression of inflammatory pathways through mechanisms collectively known as transrepression. Together, these observations position LXRs at the crossroads between metabolism and immunity. In this review, we will cover the impact of LXR activation on immune responses, with an emphasis on recent advances in the understanding of the molecular mechanisms that mediate these effects.

Roads to LXR Activation

Several natural oxidized forms of cholesterol (oxysterols) have been shown to activate LXRs at physiological concentrations. These include 24(S),25-epoxycholesterol, 22(R)-, 24(S)-, 27-hydroxycholesterol and cholestenic acid (Forman et al. 1997; Janowski et al. 1996, 1999; Lehmann et al. 1997; Song and Liao 2000). Likewise, specific intermediaries in the cholesterol biosynthetic pathway, such as desmosterol and zymosterol, are able to bind and activate LXRs (Yang et al. 2006). In addition, several compounds of plant origin, such as the plant sterol β -sitosterol (Plat et al. 2005), acanthoic acid (Jayasuriya et al. 2005) and selective acanthoic acid-related diterpenes (Traves et al. 2007), or from bacterial origin, such as the hexacyclic aromatic ketones (-)anthrabenzoquinone and (-)bischloroanthrabenzoquinone from *Streptomyces* sp. (Herath et al. 2005), have been also reported to activate LXRs.

Although LXRs contain a lipophilic ligand binding pocket (Williams et al. 2003), high doses of D-glucose and D-glucose-6-phosphate have been shown to bind to and activate LXRs (Mitro et al. 2007). These studies, however,

did not establish how glucose and its derivatives bound to these nuclear receptors. More recent studies demonstrated that LXRs were not required for the in vivo glucose-induced expression of several genes with central roles in glucose homeostasis (Denechaud et al. 2008), thus suggesting that further work is required to clarify the physiological relevance of LXR activation by glucose.

Apart from natural products, several synthetic or semi-synthetic compounds have been developed that show agonistic properties toward LXRs, as, for example, acetyl podocarpic acid anhydride that has been developed as a semi-synthetic agonist derived from extracts of the may-apple (Singh et al. 2005). Among all the compounds developed so far that show high affinity for LXRs, two nonsteroidal synthetic agonists, namely TO901317 (Schultz et al. 2000) and GW3965 (Collins et al. 2002), have been most widely used for in vitro and in vivo studies dissecting the roles of LXRs in cell biology and physiology. These compounds, though, do not discriminate between the two LXR isoforms, α and β . Based on the interest of developing isoform-specific agonists, recent studies have identified compounds that bind more selectively to one of the two isoforms. For example, n-acylthiadiazolines and certain quinoline sulfones have been shown to activate LXR β with selectivity over LXR α (Molteni et al. 2007; Ullrich et al. 2010). Moreover, as discussed in the following section, there is an interest for developing LXR ligands that enhance only specific functions of the LXR pathway. The identification of two novel LXR agonists with such properties, namely WAY-252623 and *N,N*-dimethyl-3 β -hydroxy-choleamide, has been recently reported (Kratzer et al. 2009; Quinet et al. 2009).

In physiological situations, LXRs can be activated when oxysterols are generated from accumulated cholesterol. Indeed, administration of a high cholesterol diet to mice leads to LXR activation (Peet et al. 1998). Modified low-density lipoproteins (LDL), such as acetylated or oxidized LDL is a source of LXR agonists as demonstrated in in vitro studies (Laffitte et al. 2001). During the course of infection and/or inflammation, there is the possibility that cholesterol from phagocytosed biomembranes or other sources, especially under highly oxidative conditions, may be converted into LXR-activating oxysterols. There is evidence, in fact, that the LXR α target gene *Sp- α /AIM* is induced during infection with *Listeria monocytogenes* in an LXR-dependent manner (Joseph et al. 2004). Likewise, prolonged infection with *Mycobacterium tuberculosis* also resulted in increased expression of several LXR target genes (Korf et al. 2009). These observations support the idea that endogenous LXR ligands are generated during the immune response to intracellular bacterial infection. Moreover, studies exploring the role of LXRs in macrophages actively involved in phagocytosis of apoptotic

thymocytes demonstrate that several LXR target genes are induced as a consequence of extensive phagocytosis (A-Gonzalez et al. 2009), although the exact nature of the ligands that mediate these effects remains elusive.

General Roles of LXRs in Regulation of Metabolic Functions

During the last decade, LXRs have been shown to be crucial mediators of cholesterol homeostasis in different tissues. For example, activation of LXRs leads to a marked increase in the expression of several sterol transporters from the ATP-binding cassette (ABC) family with important functions in reverse cholesterol transport (ABCA1 and ABCG1) (Repa et al. 2000b; Venkateswaran et al. 2000), sterol excretion into bile and feces and limiting sterol absorption in the intestine (ABCG5 and ABCG8) (Baldán et al. 2009; Lee et al. 2001; Lu et al. 2001; Repa et al. 2002; Yu et al. 2003). In general, LXRs also induce the expression of other molecules that participate in lipoprotein homeostasis (reviewed by Ricote et al. 2004). In addition to promoting reverse cholesterol transport, LXRs also reduce cellular uptake of cholesterol by inducing the expression of inducible degrader of the LDL receptor (Idol), an E3 ubiquitin ligase that targets several members of the LDL receptor family for degradation (Zelcer et al. 2009). Therefore, LXRs are considered as “sterol sensors” that coordinately regulate the expression of key molecules involved in sterol storage, efflux and elimination. LXR agonists have indeed shown therapeutic effectiveness in murine experimental models of atherosclerosis (Joseph et al. 2002; Terasaka et al. 2003).

Liver X receptors also participate in the regulation of genes involved in glucose metabolism, such as glucokinase in the liver and the insulin-sensitive glucose transporter 4 in adipose tissue (Laffitte et al. 2003). Consistent with these observations, LXR agonists have shown significant insulin-sensitizing effects in murine models of diet-induced obesity and insulin resistance (Commerford et al. 2007).

In addition to their role in sterol and glucose homeostasis, LXRs promote lipogenesis through the induction of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) (Repa et al. 2000a) and carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) (Cha and Repa 2007). Both SREBP-1c and ChREBP are transcription factors that control the expression of molecules integral to fatty acid biosynthesis and esterification, and mice treated with pan-LXR agonists suffer a marked increase in plasma triglyceride levels (Schultz et al. 2000), which limit the potential therapeutic advantages of these agonists as anti-atherogenic or insulin-sensitizing drugs. Based on the fact that LXR α is more abundantly expressed than LXR β in the

liver and accounts for most of the lipogenic effects of LXR agonists in this organ, alternative strategies try to identify compounds with higher selectivity for LXR β over LXR α to skip the hepatic lipogenic properties of general LXR agonists (Molteni et al. 2007; Ullrich et al. 2010). Also, two novel LXR agonists, WAY-252623 and *N,N*-dimethyl-3 β -hydroxy-cholenamide, have been shown to reduce atherosclerotic lesion progression without inducing the expression of SREBP1c or activating hepatic lipogenesis, although the mechanisms involved in these selective actions have not been described (Kratzer et al. 2009; Quinet et al. 2009).

LXRs as Negative Regulators of Inflammation

Apart from their role in the control of metabolism, LXRs also exert crucial functions in the regulation of immune responses. LXR agonists downregulate the expression of selective inflammatory genes through a process known as transrepression, which is also used by other nuclear receptors to interfere with inflammatory signaling pathways. In general, transrepression is considered to involve nuclear receptor interaction with additional proteins bound to promoter regions, rather than direct interaction with DNA (reviewed by Glass and Ogawa 2006). In the last few years, several groups have described anti-inflammatory actions of LXR agonists in different mouse models of inflammatory disease (Table 1).

In macrophages, LXR agonists are able to transrepress inflammatory pathways engaged by lipopolysaccharide (LPS) (via Toll-like receptor 4, TLR4), interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , polyinosinic:polycytidylic acid (via TLR3 activation) or interferon (IFN)- γ (Ghisletti et al. 2007; Joseph et al. 2003; Lee et al. 2009). LXR-mediated transrepression does not affect all the genes induced by these pathways. For example, the LXR agonist GW3965 repressed several genes induced by LPS, including nitric oxide synthase 2 (NOS2), IL-6 and IL-1 β , but not TNF- α (Ghisletti et al. 2007; Joseph et al. 2003; Ogawa et al. 2005). Several LXR agonists, including GW3965, were reported, however, to inhibit the induction of TNF- α by IFN- γ in astrocytes (Lee et al. 2009). In bone marrow-derived mast cells, LXR activation by 25-hydroxycholesterol or TO901317 mediated repression of IL-6 production upon engagement of the high-affinity receptor for immunoglobulin (Ig)E (Nunomura et al. 2010). In dendritic cells, LXR agonists interfered with the LPS-induced expression of IL-12 and fascin, an actin-bundling protein involved in actin polymerization in mature dendritic cells that form an immunological synapse with T lymphocytes. As a consequence, the ability of mature dendritic cells to activate T lymphocytes was impaired.

Table 1 Effects of LXR agonists on different experimental models of inflammatory disease

Model of inflammation	Agonist (administration and dose)	Anti-inflammatory effects of agonist	References
TPA-induced contact dermatitis	TO901317, GW3965 (20 μ l of a 10 mM stock). Topical administration 4 h after TPA application	Decreased ear weight and thickness Reduced edema and inflammatory cell infiltration in the dermis	Joseph et al. (2003)
TPA-induced contact dermatitis	22(R)-OH-cholesterol, 25-OH-cholesterol, GW3965 (40 μ l of 10 mM agonist). Topical administration 45 min and 4 h after TPA application	Decreased ear weight and thickness Reduced inflammatory cell infiltration (22(R)-OH-cholesterol). Decreased expression of IL-1 α and TNF- α (22(R)-OH-cholesterol)	Fowler et al. (2003)
Oxazolone-induced allergic contact dermatitis	22(R)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, GW3965 (40 μ l of 10 mM agonist). Topical administration 45 min and 4 h after oxazolone application	Decreased ear weight and thickness Reduced inflammatory cell infiltration (22(R)-OH-cholesterol). Decreased expression of IL-1 α and TNF- α (22(R)-OH-cholesterol)	Fowler et al. (2003)
Ovalbumin-induced allergic response	TO901317 (4 and 20 mg/kg/day). Intraperitoneal administration every second day starting the day before the first sensitization	Reduced production of allergen-specific IgE and IgG1	Heine et al. (2009)
Collagen-induced arthritis	GW3965 (0.3 and 1 mg/kg/day). Oral administration for 40 days starting on the day of collagen treatment	Reduced incidence of arthritis and attenuated clinical and histological severity of the disease. Reduced inflammatory cell infiltration and expression of TNF- α , IL-1 β , NOS2 and COX2 in joints. Decreased levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum	Park et al. (2010)
Atherosclerosis (ApoE ^{-/-} mice)	GW3965 (20 mg/kg/day). Oral administration daily during 3 days	Reduced expression of MMP9 in atherosclerotic aortas	Joseph et al. (2003)
Atherosclerosis (LDLR ^{-/-} mice)	TO901317 (3–10 mg/kg/day). Oral administration daily for 8 weeks during atherogenic diet	Reduced expression of tissue factor in atherosclerotic lesions	Terasaka et al. (2003)
Intraperitoneal injection of LPS	TO901317 (3 mg/kg) or GW3965 (30 mg/kg). Oral administration daily for 7 days before LPS injection	Reduced expression of tissue factor in kidneys and lungs	Terasaka et al. (2005)
LPS-induced hepatic acute phase response (intraperitoneal injection of LPS)	GW3965 (30 mg/kg/day). Administration for 4 days prior to LPS injection	Reduced expression of haptoglobin, SAA and CRP in the liver	Venteclief et al. (2010)
LPS and PepG-induced hepatic injury	GW3965 (0.3 mg/kg). Intravenous injection 30 min before LPS/PepG injection	Reduced infiltration of leukocytes, including mast cells, and decreased expression of chemokines eotaxin 1 and 2 in liver. Reduced levels of TNF- α and PGE2 in plasma	Wang et al. (2006)
LPS-induced lung injury (intranasal instillation with LPS)	GW3965 (20 mg/kg). Oral administration daily for 7 days prior to LPS treatment	Decreased protein, TBARS and cell numbers, including neutrophils, in BAL. Reduced neutrophil infiltration and MPO activity in lungs	Gong et al. (2009)
LPS-induced lung injury (aerosolized LPS)	TO901317 (50 mg/kg/day). Oral administration daily for 5 days prior to LPS treatment	Reduced polymorphonuclear cell and TNF- α in BAL. Reduced MPO activity in lungs	Smoak et al. (2008)
LPS-induced acute lung injury (vein infusion of LPS)	TO901317 (10 mg/kg). Oral administration daily for 1 week prior to LPS treatment	Decreased leukocytes, including neutrophils, and protein levels in BAL. Reduced levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6, and augmented IL-10 in BAL fluid. Reduced alveolar wall thickening, alveolar hemorrhage, interstitial edema and inflammatory cell infiltration in lungs	Wang et al. (2011)

Table 1 continued

Model of inflammation	Agonist (administration and dose)	Anti-inflammatory effects of agonist	References
Carrageenan-induced acute lung inflammation (injection of Carrageenan in the pleural cavity)	TO901317 (20 mg/kg). Intraperitoneal administration	Reduced edema, PMN infiltration and NOS2 expression in the lung. Reduced levels of TNF- α and IL-1 β in pleural exudates and lungs. Decreased nitric oxide production in pleural exudates	Crisafulli et al. (2010b)
Alzheimer disease (Tg2576)	GW3965 (33 mg/kg/day). Oral administration daily for 4 months	Decreased number of activated plaque associated microglia and IL-6 mRNA levels in the brain	Jiang et al. (2008)
EAE	TO901317 (25 mg/kg). Intraperitoneal injection daily starting 2 days prior to EAE induction	Reduced inflammation, infiltration of CD4 ⁺ T lymphocytes and macrophages, expression of IFN- γ , expression of microglial MHCII and demyelination associated with inflammation in spinal cords	Hindinger et al. (2006)
Middle cerebral artery occlusion	TO901317 and GW3965 (20 mg/kg). Intraperitoneal injection 10 min after experimental stroke	Reduced infarct volume and area. Reduced expression of NOS2, COX2, MMP9, IL-1 β , IL-6, IL-12p40 and Ccl5 in the brain	Morales et al. (2008)
Middle cerebral artery occlusion	GW3965 (20 mg/kg). Intraperitoneal injection 10 min after experimental stroke	Decreased infarct volume. Reduced infiltration of monocyte/macrophages and expression of NOS2, COX2, MCP-1, Ccl5 and IL-1 β in the brain	(Sironi et al. 2008)
Global cerebral Ischemia	GW3965 (20 mg/kg). Intraperitoneal injection 10 min after surgery	Reduced nuclear localization of the p65 subunit of NF- κ B and decreased expression of COX2 in the brain	Cheng et al. (2010)
Spinal cord injury	TO901317 (20 mg/kg). Intraperitoneal administration 1 and 6 h after surgery	Reduced severity of spinal cord trauma. Decreased infiltration of neutrophils, reduced expression of TNF- α , IL-1 β and NOS2, and decreased I κ B degradation and nuclear localization of the p65 subunit of NF- κ B in spinal cord tissue	Paterniti et al. (2010)
Splanchnic artery occlusion	TO901317 (20 mg/kg). Intravenous administration 15 min prior to reperfusion	Reduced tissue injury, PMN infiltration, expression of adhesion molecules ICAM-1 and P-selectin and cytokines TNF- α and IL-1 β in the ileum. Decreased I κ B degradation and nuclear localization of the p65 subunit of NF- κ B, and reduced levels of p38, ERK and JNK activation in the ileum	Crisafulli et al. (2010a)
Ultraviolet irradiation-induced photoaging	TO901317 (50 μ l of 0.1–10 mM stocks). Topical administration after each exposure to ultraviolet irradiation (5 times per week)	Reduced skin thickening and wrinkle formation	Chang et al. (2008)

BAL bronchoalveolar lavage, COX2 cyclooxygenase 2, CRP C-reactive protein, EAE experimental autoimmune encephalomyelitis, ERK extracellularly-regulated kinase, ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1, JNK c-Jun N-terminal kinase, LDLR LDL receptor, MCP monocyte chemoattractant protein, MHCII major histocompatibility complex type II, MMP9 matrix metalloproteinase 9, MPO myeloperoxidase, OH-*cho*l hydroxycholesterol, PGE2 prostaglandin E2, PMN polymorphonuclear cells, SAA serum amyloid A, TBARS thiobarbituric acid reactive substances, TPA 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

Interestingly, the inhibitory effects of LXR agonists were not observed when dendritic cells were activated through the CD40 ligand (Geyeregger et al. 2007).

The mechanisms underlying these promoter, stimulus and perhaps cell type-specific effects are still subject of study. Initial studies in murine macrophages described that LXR-mediated transrepression of the LPS pathway targeted nuclear factor (NF)- κ B signaling, but not activating protein (AP)-1 (Joseph et al. 2003). This effect contrasted with the actions mediated by some other members of the nuclear receptor superfamily, such as the glucocorticoid receptor (GR), which interfered with both NF- κ B and AP-1 to downregulate a broad range of inflammatory genes (Galon et al. 2002), or the all-trans-retinoic acid receptor, which repressed AP-1 regulated genes by altering the composition of fos- and jun-related proteins within the AP-1 heterodimer (Benkoussa et al. 2002).

In the absence of proinflammatory stimuli, several inflammatory genes are actively repressed by a co-repressor complex that acts on their promoters (Lee et al. 2000; Ogawa et al. 2004). Induction of transcription of these genes in response to a pro-inflammatory signal requires an initial de-repression step in which the co-repressor complex is removed from the gene promoter and at least some of its components are subjected to ubiquitylation and proteasome-dependent degradation (Hoberg et al. 2004). Nuclear receptor co-repressor (NCoR) and silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors (SMRT) were initially identified as co-repressor proteins involved in the process by which several nuclear receptors actively repress the expression of their own target genes in the absence of an agonistic ligand (Chen and Evans 1995; Hörlein et al. 1995). Later on, NCoR and SMRT were also shown to be part of the co-repressor complexes that mediate basal repression of pro-inflammatory genes in the absence of the pro-inflammatory stimulus (Lee et al. 2000; Ogawa et al. 2004). Interestingly, interference with the release of co-repressor proteins from inflammatory gene promoters has been reported as the mechanism how several nuclear receptors, including LXRs and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), inhibit the expression of LPS-induced genes in macrophages (Ghisletti et al. 2007; Pascual et al. 2005). The expression of functional NCoR is required for nearly all the repressive effects of LXR on LPS target genes. For a subset of these genes, SMRT was also necessary to establish a stable co-repressor complex (Ghisletti et al. 2007, 2009). LXR-mediated inhibition of the acute phase response in the liver is also based on prevention of co-repressor complex removal from inflammatory gene promoters (Venteclef et al. 2010). In contrast, NCoR knockdown in astrocytes did not affect LXR-mediated transrepression of IFN- γ induced genes (Lee et al. 2009), which suggests that either SMRT can replace

the absence of NCoR or a different mechanism independent of retention of these co-repressor complexes mediates the repressive effects of LXR agonists in that system. In fact, interaction with co-repressor complexes is not a prerequisite for the inhibition of inflammatory gene expression by all nuclear receptors. As an example, several models for GR-mediated transrepression have been proposed which interfere with selective NF- κ B-dependent genes in a co-repressor-independent manner (reviewed by Glass and Ogawa 2006).

Studies on the mechanisms involved in nuclear receptor action led to the discovery of the association between nuclear receptors and members of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family (Poukka et al. 2000; Tian et al. 2002). SUMOylation is a reversible post-translational modification consisting in the conjugation of a SUMO to a substrate protein. In mammals, there are three members in the SUMO family, namely SUMO-1, -2 and -3, which can be conjugated to target proteins. SUMOylation requires first the activation of a SUMO by a heterodimeric SUMO-1 activating enzyme (E1 enzyme), which cleaves a C-terminal peptide from SUMO in an ATP-dependent manner. Then, activated SUMO is temporarily transferred to a conjugating enzyme (E2 enzyme), generally ubiquitin carrier protein 9, which subsequently mediates the conjugation to the target protein in cooperation with SUMO E3 ligases (reviewed by Treuter and Venteclef 2011). Members of the protein inhibitor of activated STAT (PIAS) family are the most characteristic SUMO E3 ligases (Palvimo 2007), although other proteins including histone deacetylase (HDAC)2 and HDAC4/5 can also act as E3 ligases (reviewed by Treuter and Venteclef 2011). In general, nuclear receptor SUMOylation is associated with transcriptional repression. However, SUMOylation of retinoid-related orphan receptor- α is an exception, as it potentiates transcriptional activation (Hwang et al. 2009).

Liver X receptor-mediated transrepression has been reported as a SUMO-dependent process. In murine macrophages, GW3965-activated LXRs underwent SUMOylation, which prevented the clearance of co-repressor complexes from the promoter of specific inflammatory genes (Ghisletti et al. 2007). The proteins implicated in LXR SUMOylation seem to vary between cell types and perhaps the inflammatory environment. In macrophages stimulated with LPS, GW3965-activated LXR β was SUMOylated by SUMO-2/3 in a process that involved HDAC4 as the E3 ligase (Ghisletti et al. 2007). More recent studies in astrocytes stimulated with IFN- γ proposed the use of different SUMOylation mechanisms for LXR α and β in response to LXR ligands: LXR α being SUMOylated by SUMO2/3 using HDAC4 as the E3 ligase, and LXR β being SUMOylated by SUMO1, with PIAS1 acting as the E3 ligase (Fig. 1). PIAS1 has been also

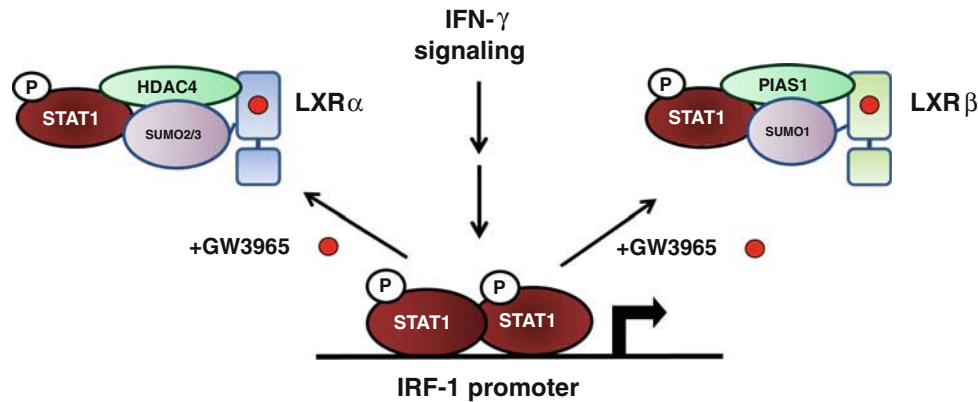


Fig. 1 Model that describes parallel mechanisms used by LXR α and β to inhibit IFN- γ -induced expression of IRF-1. Activation of astrocytes with IFN- γ leads to STAT-1 recruitment to the IRF-1 promoter. In the presence of the LXR agonist GW3965, LXR α becomes SUMOylated by SUMO2/3 using HDAC4 as an E3 ligase,

whereas LXR β is SUMOylated by SUMO1, with PIAS1 acting as an E3 ligase. SUMOylated LXRs form a complex with STAT1 resulting in inhibited recruitment of STAT1 to the IRF-1 promoter (Lee et al. 2009)

implicated in PPAR- γ SUMOylation (Pascual et al. 2005). SUMOylated LXRs formed a complex with STAT1 in astrocytes resulting in inhibited recruitment of STAT1 to the interferon-regulatory factor (IRF)-1 promoter, without affecting STAT1 phosphorylation or its nuclear translocation (Lee et al. 2009). An independent report, however, did observe reduced levels of IFN- γ -induced STAT1 serine and tyrosine phosphorylation in human THP-1 macrophages in response to 22 (R)-hydroxycholesterol (Li et al. 2011).

Two proteins previously identified within co-repressor complexes have been recently shown to directly interact with SUMOylated LXRs. In the liver, transrepression of

the acute phase response by GW3965 was selectively mediated by LXR β . In the presence of GW3965, LXR β underwent SUMOylation by SUMO-2/3 and was recruited to a co-repressor complex on the C-reactive protein and haptoglobin gene promoters through the interaction with G protein pathway suppressor (GPS)2 (Fig. 2) (Ventecler et al. 2010). Interestingly, the interaction between LXR and GPS2 may also play an important role in LXR-mediated transactivation, as it facilitated recruitment of GW3965-activated LXR to at least an ABCG1-specific promoter/enhancer unit and subsequent histone demethylation of that genomic region. GPS2 was capable of binding both LXR α

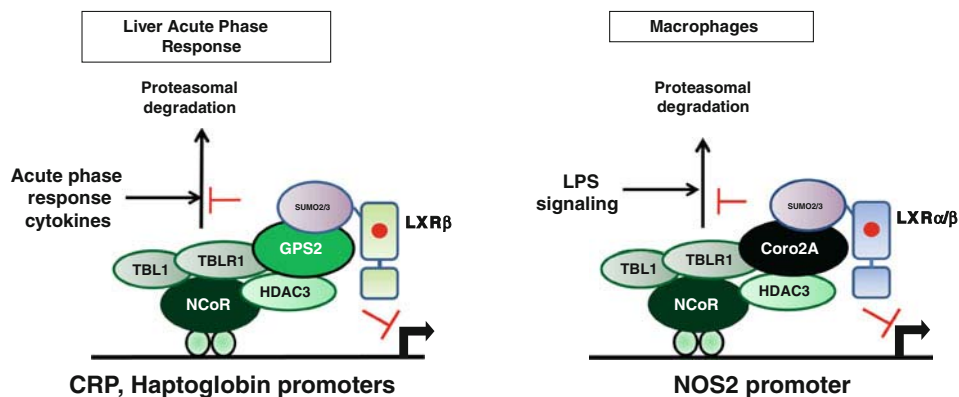


Fig. 2 Models that describe the mechanisms used by LXRs to inhibit transcriptional responses to LPS in different cell types. In the absence of proinflammatory stimuli, co-repressor complexes, typically containing NCoR or SMRT, transducin (beta)-like 1 X-linked (TBL1) and TBL1-related protein 1 (TBLR1), bind to inflammatory gene promoters to keep their basal expression in a repressed state. In response to LPS stimulation, key components within co-repressor complexes are subject to proteasomal degradation, thus releasing repression from inflammatory gene promoters. In the liver (left side), transrepression of the LPS-induced acute phase response by GW3965

is selectively mediated by LXR β . SUMOylation of LXR β by SUMO-2/3 in response to GW3965 activation results in recruitment of LXR β to a co-repressor complex on the *Crp* and *Haptoglobin* gene promoters through the interaction with GPS2, thus preventing co-repressor complex removal from those promoters (Ventecler et al. 2010). In macrophages (right side), LXR mediated transrepression of the *Nos2* promoter involved conjugation of LXR β to SUMO2/3 and the interaction of SUMOylated LXR β with CORO2A rather than GPS2, preventing actin recruitment and NCoR turnover on the *Nos2* gene promoter (Huang et al. 2011)

and LXR β , most probably through a surface that is distinct from the co-activator-interaction motif in the LXR molecule (Jakobsson et al. 2009). In macrophages, LXR-mediated transrepression involved interaction of SUMOylated LXRs with coronin 2A (CORO2A) rather than GPS2. CORO2A is an actin-binding protein that contains a conserved SUMO2/3-interaction motif and is expressed mainly in the nucleus at least in primary macrophages (Huang et al. 2011). CORO2A localized on several NCoR-dependent promoters in resting macrophages and participated in TLR-induced NCoR turnover from the *Nos2* promoter through the interaction with oligomeric nuclear actin, although the exact role of actin in this process remains enigmatic. The model proposed by Huang et al. (2011) suggests that SUMOylated LXRs bind to the SUMO2/3-interaction motif in CORO2A, thus putatively preventing actin recruitment and NCoR turnover on the *Nos2* promoter (Fig. 2).

Interestingly, serine phosphorylation of LXRs by signals that activate calcium/calmodulin-dependent protein kinase II γ , such as the TLR1/TLR2 ligand Pam₃CSK, resulted in the loss of the LXR-mediated transrepression potential. Such a phosphorylation step occurred on serine 427 and led to LXR β deSUMOylation by sentrin/SUMO-specific protease 3 and its subsequent release from CORO2A (Huang et al. 2011). These observations raise the possibility that signal-induced negative regulation of LXR-mediated transrepression may contribute to chronic inflammatory processes.

Molecular modeling suggests that the ligand binding domain of human LXR β contains a putative SUMO acceptor lysine in close proximity to the area used for heterodimerization with RXR (Treuter and Venteclef 2011). The requirement of LXR–RXR heterodimerization has been well established for LXR-mediated transactivation (Willy et al. 1995). However, whether or not this heterodimerization is required for LXR-mediated transrepression remains uncertain. So far, no reports demonstrate RXR recruitment to LXR-transrepressed loci. In fact, Treuter and Venteclef (2011) observed no recruitment of RXR to SUMO-dependent loci, whereas RXR was recruited in an LXR-dependent manner to classical positively regulated LXR/RXR target genes (Wagner et al. 2003). Based on the model proposed by Jakobsson et al. (2009), GPS2 binds LXRs probably once they have formed heterodimers with RXR on the LXRE of the ABCG1 promoter, which raises the question of whether a complex between GPS2 and the LXR–RXR heterodimer is also necessary for the transrepressive effects described for the GPS2–LXR axis. More studies focused on the role of RXR heterodimerization will be necessary to clarify these issues.

Apart from LXR-mediated transrepression, indirect effects of LXRs also contribute to relevant negative effects

on immune responses. As an example, activation of LXRs by TO901317 reduced secreted IgE in activated B lymphocytes, without affecting IgE class switch recombination or its transcription. LXR activation resulted in reduced phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase 2 and increased membrane expression of CD23, the low-affinity receptor for IgE, which helps reduce IgE secretion as a negative feedback loop (Heine et al. 2009).

LXRs Regulate Positively the Expression of Genes with Specific Roles in Immune Responses

Based on the anti-inflammatory actions of LXR agonists, one could predict that LXR activation would impact on the capability of immune cells to establish an aggressive response against pathogens. In fact, LXR-deficient mice have been shown to be markedly resistant to systemic infection with *Leishmania chagasi/infantum*. Primary macrophages derived from mice lacking LXRs generated higher levels of nitric oxide and IL-1 β and were able to kill parasites in the presence of IFN- γ more efficiently than wild-type macrophages (Bruhn et al. 2010). However, in other models of infection, LXR deficiency leads to opposite effects. For example, LXR-deficient mice were more susceptible to infection by *M. tuberculosis*, in correlation with the fact that these mice were not capable of mounting an effective early neutrophilic airway response to infection and helper T cell (Th)1 and Th17 responses were abrogated in the lungs of these animals (Korf et al. 2009). Likewise, mice deficient in LXRs were more susceptible to infection by the intracellular bacteria *L. monocytogenes* and reconstitution of irradiated wild-type mice with bone marrows from LXR-deficient mice conferred susceptibility toward these bacteria (Joseph et al. 2004). These observations suggest that the LXR pathway exerts complex regulatory actions on immune responses that extend beyond transrepression of proinflammatory responses and may lead to different outcomes depending on the invading pathogen.

Liver X receptor agonists have been shown to regulate positively the expression of the anti-inflammatory enzyme arginase II (Marathe et al. 2006). Arginase activity catalyzes the conversion of L-arginine into L-ornithine and urea, which are precursors for the synthesis of polyamines and collagen. The consumption of L-arginine for polyamine production results in decreased availability of this amino acid for nitric oxide synthesis mediated by NOS2, although arginase activity may also inhibit nitric oxide production by several other means, including repression of the translation and stability of the NOS2 protein, uncoupling or inhibition of NOS activity by end products of arginase activity, and sensitization of NOS to the endogenous inhibitor asymmetric dimethyl-L-arginine (Durante et al.

2007). Based on these effects, LXR agonists have the potential to interfere with nitric oxide production both by inhibiting NOS2 expression and upregulating arginase II expression and therefore indirectly affecting NOS activity. These effects may especially compromise macrophage responses during infections by *Leishmania*, as the pathogen can benefit both from reduced nitric oxide production and from polyamines derived from arginase activity (Kropf et al. 2005), although Bruhn et al. (2010) were not able to correlate changes in arginase expression with resistance to *L. chagasi/infantum* in LXR-deficient mice. Recently, LXR agonists have been also shown to exert indirect positive regulation of arginase I expression via upregulation of IRF-8 (Pourcet et al. 2011). In those studies, IRF-8 was identified as a direct target of LXR α in Raw264.7 macrophages that overexpress human LXR α . IRF-8 is a transcription factor whose expression is restricted to immune cells and it plays important roles in regulation of gene expression in response to type I and II IFNs (Kanno et al. 2005). The model proposed by Pourcet et al. described the association of IRF-8 with the transcription factor PU.1 on a composite element in the promoter region of the arginase I gene. Occupancy of this element by IRF-8/PU.1 was increased by the LXR agonist TO901317, consistent with the induction of IRF-8 expression in response to LXR activation (Pourcet et al. 2011). It would be interesting to know whether the LXR α /IRF-8/PU.1 axis exerts other regulatory effects on additional genes.

Several intracellular pathogens, e.g., *Chlamydia pneumoniae* and *M. tuberculosis*, have developed mechanisms to convert host macrophages into foam cells (lipid-laden macrophages). Somehow, these pathogens meet nutritional advantages by residing within cells that accumulate lipids (Cao et al. 2007; Peyron et al. 2008). As an example, Raw 264.7 macrophages infected with *C. pneumoniae* became foam cells with increased contents of cholesteryl esters when co-cultured in the presence of LDL (Cao et al. 2007), in line with the idea that infections with *C. pneumoniae* accelerate atherosclerosis (Moazed et al. 1999). The process by which certain pathogens convert macrophages into foam cells is not completely understood. *C. pneumoniae*-induced acceleration of atherosclerosis in apoE-deficient mice was further enhanced in animals deficient in both apoE and LXR α (Naiki et al. 2008), suggesting that interference with LXR-induced mechanisms for cholesterol efflux may provide a strategy for pathogen-induced lipid accumulation. Interestingly, infection by other microorganisms, such as *Escherichia coli* or RNA virus influenza A, blocked the induction of LXR target genes, including ABCA1, ABCG1 and apoE, in macrophages. Activation of TLR3 and TLR4 by microbial ligands also mimicked these effects via activation of IRF-3, leading to downregulation of cholesterol efflux from macrophages (Castrillo et al.

2003), which suggests that pathogenic pathways signaling via IRF-3 have the capability to interfere with LXR-mediated cholesterol homeostasis. Conversely, independent groups have shown that treatment with the LXR agonist GW3965 leads to reduction of foam cell formation during infection by *C. pneumoniae* (Cao et al. 2007; Chen et al. 2008), which probably occurs by virtue of the upregulation of ABCA1 and other molecules with key roles in cholesterol efflux.

Several years ago, LXR activation was shown to promote macrophage survival during infection by several bacteria, including *L. monocytogenes* (Joseph et al. 2004), *Bacillus anthracis*, *E. coli* and *Salmonella typhimurium* and in response to several forms of cellular stress, such as growth factor deprivation (Valledor et al. 2004). These effects correlated with downregulated expression of several members of the caspase family and other pro-apoptotic factors (Valledor et al. 2004) and with induction of an apoptosis inhibitory protein secreted by macrophages (AIM; also known as Sp- α) (Joseph et al. 2004; Valledor et al. 2004), which was shown to be a specific target of LXR α (Joseph et al. 2004). Induction of AIM was also attributed a role in prevention of macrophage apoptosis within atherosclerotic lesions (Arai et al. 2005), although the mechanism used by AIM to promote macrophage survival to date remains elusive.

Macrophage-secreted AIM has been recently shown to be endocytosed into adipocytes via the scavenger receptor CD36. Within adipocytes, AIM bound to and inhibited the activity of cytosolic fatty acid synthase, therefore reducing the size of lipid droplets and stimulating the efflux of free fatty acids and glycerol from adipocytes (Kurokawa et al. 2010). In particular, palmitic and stearic acids released upon AIM-dependent adipocyte lipolysis were able to engage TLR4 signaling and stimulate the production of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1, -2 and -3, and chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ccl5)/Rantes in adipocytes. Chemokines released by adipocytes are important for monocyte/macrophage recruitment to adipose tissue. Possibly for this reason, mice deficient in AIM showed reduced obesity-associated infiltration of inflammatory macrophages and production of inflammatory cytokines in the adipose tissue (Kurokawa et al. 2011). However, these studies did not evaluate whether AIM deficiency additionally resulted in decreased macrophage survival in the adipose tissue. The pro-inflammatory actions of AIM contrast with the general role of LXRs as negative regulators of inflammation. It would be interesting to know whether the lipolysis-mediated proinflammatory activities of AIM are also observed under conditions that simultaneously stimulate LXR-mediated transrepression.

Liver X receptor α can be phosphorylated at serine 198 by casein kinase II. Phosphorylation of LXR α on this site seems to exert repressive effects on AIM expression, as overexpression of LXR α with a mutation at serine 198

resulted in increased induction of AIM in response to the LXR agonist TO901317. These effects were specific toward selective LXR targets, also including lipoprotein lipase, but not ABCA-1 and SREBP-1c (Torra et al. 2008). Whether this selective modulation of target genes also occurs *in vivo* deserves to be uncovered in the future.

Recent studies have highlighted a role for the LXR pathway in the positive regulation of phagocytosis of apoptotic cells. Several years ago, ABCA1 was reported to participate in the regulation of phagocytosis. ABCA1 expression favored engulfment by inducing local modifications of the membrane composition in phospholipids (Hamon et al. 2000), which can determine lateral mobility or clustering of receptors at intercellular contact sites and the recruitment of dynamin to forming phagosomes. Recently, c-mer tyrosine kinase (Mertk) has been also shown to be a direct target for LXR (A-Gonzalez et al. 2009). Mertk is a member of the Axl/Mer/Tyro3 receptor tyrosine kinase family that also participates in macrophage-mediated engulfment and clearance of apoptotic cells. Mertk functions as a receptor for Gas6, a protein that binds to phosphatidylserine exposed as an “eat-me” signal in the external side of the plasma membrane of dying cells (Scott et al. 2001). As mentioned earlier in this review, phagocytosis of apoptotic cells resulted in LXR activation (A-Gonzalez et al. 2009). Therefore, apoptotic cells are able to promote their own clearance by providing a mechanism to activate LXR and induce Mertk and ABCA1 in phagocytic cells. ABCA1 may also play an extra role in this process by facilitating the efflux of excess cholesterol derived from extensive phagocytosis of dead cells. Interestingly, functional expression of LXRs was required for inhibition of the expression of several proinflammatory mediators and for transcriptional induction of the deactivating cytokines tissue growth factor β and IL-10 in macrophages that had engulfed apoptotic cells. These observations suggest that the LXR pathway serves an important role also in macrophage deactivation in response to phagocytosis of apoptotic cells. In fact, animals deficient in LXRs exhibited both a defect in phagocytosis of apoptotic cells and a breakdown in self-tolerance with development of autoantibodies against nuclear proteins and double-stranded DNA and development of autoimmune glomerulonephritis (A-Gonzalez et al. 2009). In line with these observations, administration of GW3965 ameliorated the progression of autoimmune disease in a murine model of systemic lupus erythematosus (A-Gonzalez et al. 2009).

Macrophages also exert an important angiogenic activity in the context of wound healing, chronic inflammation and cancer. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a cytokine produced by macrophages that promotes angiogenesis and vasculogenesis, was shown several years ago to be a direct target of positive transcriptional regulation by

LXRs. Induction of VEGF expression by LXR agonists was independent of the activation of hypoxia-inducible factor-1 α (Walczak et al. 2004). These observations suggested a putative role for LXRs in the regulation of angiogenesis.

In dendritic cells, LXR agonists have been shown to increase the expression of CC chemokine receptor-7 (CCR7) (Feig et al. 2010), which is a receptor for the chemokines Ccl19 and Ccl21 (Ricart et al. 2011). In atherosclerotic apoE-deficient mice, treatment with the LXR agonist TO901317 resulted in a CCR7-dependent decrease in CD68⁺ cells (putatively macrophages and dendritic cells) within atherosclerotic plaques, indicative of atherosclerosis regression. In apoE-deficient mice transplanted with aortic arches from apoE-deficient mice with a bone marrow deficiency of either LXR α or LXR β , the expression of CCR7, the emigration of CD68⁺ cells and the regression of atherosclerotic plaques were reduced. The CCR7 gene promoter was indeed shown to contain a functional LXRE. These observations suggest that LXRs potentiate CCR7-mediated monocyte-derived cell egress during atherosclerosis regression in mice (Feig et al. 2010). These observations contrast, however, with results obtained in other animal models. In particular, tumors have been shown to produce putative LXR agonists that inhibit the expression of CCR7 in dendritic cells and therefore interfere with CCR7-mediated dendritic cell migration to secondary lymphoid organs (Villablanca et al. 2010). Interestingly, tumors expressing the enzyme sulfotransferase (SULT)1B1b, an enzyme that transfers sulfate groups to oxysterols leading to their inactivation as LXR agonists, were not able to inhibit dendritic cell migration to tumor-draining lymph nodes. Moreover, inflammatory responses developed more efficiently within these tumors. These observations suggest that inhibition of CCR7 by LXR agonists that are generated by tumor cells represents a strategy for immunoescaping (Villablanca et al. 2010). Inhibition of the migration of dendritic cells by LXR agonists was also reported in the context of infection by human immunodeficiency virus (HIV). Migration of HIV-1-carrying dendritic cells from the mucosa to draining lymph nodes contributes to virus dissemination toward CD4⁺ T lymphocytes, a process known as trans-infection, which is enhanced by simultaneous TLR-induced maturation of dendritic cells. In the model studied by Hanley et al. (2010), LXR agonists interfered with dendritic cell maturation and their production of proinflammatory cytokines. LXR agonists prevented TLR-upregulation of CCR7, which correlated with decreased dendritic cell migration in response to the chemokine Ccl21. In addition to these observations, LXR activation inhibited the capture of HIV-1 by dendritic cells. Intracellular cholesterol has been shown to be required for the capture of HIV-1 by dendritic

cells. The inhibitory effects of LXR agonists on HIV capture were based on increased ABCA1-mediated cholesterol efflux in those cells (Hanley et al. 2010). In contrast to the inhibitory role of LXR agonists on dendritic cell maturation, administration of LXR agonists resulted in increased expression of maturation markers, such as CD80 and CD86, in human monocyte-derived dendritic cells. In mature dendritic cells, LXR activation augmented the production of inflammatory cytokines, including IL-12, TNF- α , IL-6 and IL-8, and increased the capacity of these cells to activate CD4⁺ T cell proliferation upon stimulation with TLR4 or TLR3 ligands, with prolonged NF- κ B signaling observed under these conditions (Töröcsik et al. 2010). Molecular studies aimed at identifying the mechanisms involved in LXR-mediated regulation of dendritic cell biology may help clarify the discrepancies between activating and repressing effects of LXR agonists on this cell type (e.g., on CCR7 expression) in different experimental models.

LXRs as Regulators of Immune Cell Proliferation

Several groups have reported the capability of LXR agonists to exert anti-proliferative actions in a number of cell types (Blaschke et al. 2004; Chuu et al. 2007; Meng et al. 2009; Vedin et al. 2009), including T lymphocytes and macrophages (Bensinger et al. 2008; Geyeregger et al. 2009; Kim et al. 2010; Pascual-García et al. 2011). In T lymphocytes, LXR agonists inhibited mitogen- and antigen-driven proliferation through a pathway involving functional expression of ABCG1, which suggests that reduction of cellular cholesterol contents due to increased cholesterol efflux represents a mechanism for the LXR-mediated anti-proliferative effects in these cells. Indeed, these studies revealed that the LXR pathway was negatively regulated during T cell proliferation. T cell expansion in response to anti-CD3 antibodies correlated with enhanced expression of the LXR ligand-inactivating enzyme SULT2B1. As a consequence, reduced expression of the LXR target genes ABCA1 and ABCG1 was observed in proliferating T cells. Simultaneously to these effects, the SREBP-2 pathway for cholesterol synthesis was upregulated. Reduced expression of ABCG1 was proposed to affect the intracellular distribution of cholesterol and represent a strategy for T cells to ensure adequate progression through the cell cycle. Conversely, lymphocytes deficient in LXR showed higher levels of proliferation during antigen-driven responses (Bensinger et al. 2008). The ability of LXR agonists to limit the expansion of T cell populations reveals, therefore, the capability of the LXR pathway to interfere with the onset of adaptive immune responses.

Liver X receptor agonists also inhibited the proliferation of macrophages in an *in vivo* model of concanavalin A-induced peritonitis. *In vitro* experiments revealed that the anti-proliferative actions of LXR agonists in primary bone marrow-derived macrophages were independent of functional expression of ABCG1, ABCA1 or apoE (Pascual-García et al. 2011), which, in comparison with the observations obtained from T cells, suggests that different mechanisms account for the anti-proliferative effects of LXR agonists in distinct cell types. In macrophages, LXR activation resulted in changes in the protein expression of several members of the cyclin and cyclin-dependent kinase family. LXR activation did not lead to a reduction in the expression of S-phase kinase-associated protein 2, a molecule involved in ubiquitin-mediated degradation of the cell cycle negative regulator p27Kip1 (Carrano et al. 1999), in contrast to what had been observed in some other cellular systems (Blaschke et al. 2004; Chuu et al. 2007). In the same line of evidence, expression of p27Kip1 was not required for the LXR anti-proliferative effects in macrophages (Pascual-García et al. 2011). More work will have to be developed to know whether distinct anti-proliferative mechanisms reported in different cell types derive from common originating effects.

Future Perspectives

In the last decade, the identification of positive and negative effects of LXR agonists on target genes with key roles in the immune response has opened the door to the consideration of pharmacological strategies based on LXR activation for treating disorders highly dependent on inflammatory or other type of immune responses. Based on the identification of binding sites through recent genome-wide profiling studies (Boergesen et al. 2012), novel genes regulated by LXRs are expected to be reported in the subsequent years, which will help understand global effects in the organism mediated by these nuclear receptors. Development of agonists or combined treatments that selectively mediate the transrepressing or transactivating actions of LXRs may be of interest to impede human disease. The roles of posttranscriptional modifications of LXRs deserve further attention in this context. As described early in this review, several natural compounds from bacterial or plant origin have been shown to exert LXR agonistic activity. *In vivo* studies directed at the understanding of the impact of such agonists on positive/negative regulation of LXR-dependent gene expression will help define whether the development of preventive strategies based on the use of natural agonists through the diet may help reduce the incidence of long-term chronic diseases with either an inflammatory or an autoimmunity component.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (SAF2010-14989) and the Fundació Marató de TV3 (080930) (to A. F. Valledor.). M. Pascual-García is recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Education (FPU program).

References

- A-Gonzalez N, Bensinger SJ, Hong C et al (2009) Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31:245–258
- Arai S, Shelton JM, Chen M et al (2005) A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpa/Api6 in atherosclerosis development. *Cell Metab* 1:201–213
- Baldán Á, Bojanic DD, Edwards PA (2009) The ABCs of sterol transport. *J Lipid Res* 50(Suppl):S80–S85
- Benkoussa M, Brand C, Delmotte M-H et al (2002) Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. *Mol Cell Biol* 22:4522–4534
- Bensinger SJ, Bradley MN, Joseph SB et al (2008) LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 134:97–111
- Blaschke F, Leppanen O, Takata Y et al (2004) Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circ Res* 95:e110–e123
- Boergesen M, Pedersen TA, Gross B et al (2012) Genome-wide profiling of LXR, RXR and PPAR α in mouse liver reveals extensive sharing of binding sites. *Mol Cell Biol* 32:852–867
- Bruhn KW, Marathe C, Maretti-Mira AC et al (2010) LXR deficiency confers increased protection against visceral *Leishmania* infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e886
- Cao F, Castrillo A, Tontonoz P et al (2007) *Chlamydia pneumoniae*-induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 75:753–759
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A et al (1999) SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1:193–199
- Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA et al (2003) Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 12:805–816
- Cha JY, Repa JJ (2007) The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282:743–751
- Chang KCN, Shen Q, Oh IG et al (2008) Liver X receptor is a therapeutic target for photoaging and chronological skin aging. *Mol Endocrinol* 22:2407–2419
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454–457
- Chen S, Sorrentino R, Shimada K et al (2008) *Chlamydia pneumoniae*-induced foam cell formation requires MyD88-dependent and -independent signaling and is reciprocally modulated by liver X receptor activation. *J Immunol* 181:7186–7193
- Cheng O, Ostrowski RP, Liu W et al (2010) Activation of liver X receptor reduces global ischemic brain injury by reduction of nuclear factor-kappaB. *Neuroscience* 166:1101–1109
- Chuu CP, Kokontis JM, Hiipakka RA et al (2007) Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J Biomed Sci* 14:543–553
- Collins JL, Fivush AM, Watson MA et al (2002) Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* 45:1963–1966
- Commerford SR, Vargas L, Dorfman SE et al (2007) Dissection of the insulin-sensitizing effect of liver X receptor ligands. *Mol Endocrinol* 21:3002–3012
- Crisafulli C, Di PR, Mazzon E et al (2010a) Liver X receptor agonist treatment reduced splanchnic ischemia and reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 87:309–321
- Crisafulli C, Mazzon E, Paterniti I et al (2010b) Effects of liver X receptor agonist treatment on signal transduction pathways in acute lung inflammation. *Respir Res* 11:19
- Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM et al (2008) ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118:956–964
- Durante W, Johnson FK, Johnson RA (2007) Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:906–911
- Edwards PA, Kast HR, Anisfeld AM (2002) BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res* 43:2–12
- Feig JE, Pineda-Torra I, Sanson M et al (2010) LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. *J Clin Invest* 120:4415–4424
- Forman BM, Ruan B, Chen J et al (1997) The orphan nuclear receptor LXR α is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10588–10593
- Fowler AJ, Sheu MY, Schmutz M et al (2003) Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J Invest Dermatol* 120:246–255
- Galon J, Franchimont D, Hiroi N et al (2002) Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J* 16:61–71
- Geyeregger R, Zeyda M, Bauer W et al (2007) Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* 109:4288–4295
- Geyeregger R, Shehata M, Zeyda M et al (2009) Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes. *J Leukoc Biol* 86:1039–1048
- Ghisletti S, Huang W, Ogawa S et al (2007) Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPAR γ . *Mol Cell* 25:57–70
- Ghisletti S, Huang W, Jepsen K et al (2009) Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev* 23:681–693
- Glass CK, Ogawa S (2006) Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6:44–55
- Gong H, He J, Lee JH et al (2009) Activation of the liver X receptor prevents lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Biol Chem* 284:30113–30121
- Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O et al (2000) ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2:399–406
- Hanley TM, Blay Puryear W, Gummuluru S et al (2010) PPAR γ and LXR signaling inhibit dendritic cell-mediated HIV-1 capture and trans-infection. *PLoS Pathog* 6:e1000981
- Heine G, Dahten A, Hilt K et al (2009) Liver X receptors control IgE expression in B cells. *J Immunol* 182:5276–5282
- Herath KB, Jayasuriya H, Guan Z et al (2005) Anthrabenoxocinones from *Streptomyces* sp. as liver X receptor ligands and antibacterial agents. *J Nat Prod* 68:1437–1440
- Hindinger C, Hinton DR, Kirwin SJ et al (2006) Liver X receptor activation decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 84:1225–1234

- Hoberg JE, Yeung F, Mayo MW (2004) SMRT derepression by the I κ B kinase alpha: a prerequisite to NF- κ B transcription and survival. *Mol Cell* 16:245–255
- Hörlein AJ, Näär AM, Heinzl T et al (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397–404
- Huang W, Ghisletti S, Saijo K et al (2011) Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes. *Nature* 470:414–418
- Hwang EJ, Lee JM, Jeong J et al (2009) SUMOylation of ROR α potentiates transcriptional activation function. *Biochem Biophys Res Commun* 378:513–517
- Jakobsson T, Venticlef N, Toresson G et al (2009) GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus. *Mol Cell* 34:510–518
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR et al (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728–731
- Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA et al (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β . *Proc Natl Acad Sci USA* 96:266–271
- Jayasuriya H, Herath KB, Ondeyka JG et al (2005) Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J Nat Prod* 68:1247–1252
- Jiang Q, Lee CYD, Mandrekar S et al (2008) ApoE promotes the proteolytic degradation of A β . *Neuron* 58:681–693
- Joseph SB, McKilligin E, Pei L et al (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7604–7609
- Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA et al (2003) Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9:213–219
- Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A et al (2004) LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* 119:299–309
- Kanno Y, Levi BZ, Tamura T et al (2005) Immune cell-specific amplification of interferon signaling by the IRF-4/8-PU.1 complex. *J Interf Cytokine Res* 25:770–779
- Kim KH, Lee GY, Kim JI et al (2010) Inhibitory effect of LXR activation on cell proliferation and cell cycle progression through lipogenic activity. *J Lipid Res* 51:3425–3433
- Korf H, Vander Beken S, Romano M et al (2009) Liver X receptors contribute to the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *J Clin Invest* 119:1626–1637
- Kratzer A, Buchebner M, Pfeifer T et al (2009) Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE $^{-/-}$ mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 50:312–326
- Kropf P, Fuentes JM, Fähnrich E et al (2005) Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J* 19:1000–1002
- Kurokawa J, Arai S, Nakashima K et al (2010) Macrophage-derived AIM is endocytosed into adipocytes and decreases lipid droplets via inhibition of fatty acid synthase activity. *Cell Metab* 11:479–492
- Kurokawa J, Nagano H, Ohara O et al (2011) Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is required for obesity-associated recruitment of inflammatory macrophages into adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:12072–12077
- Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R et al (2001) Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol* 21:7558–7568
- Laffitte BA, Chao LC, Li J et al (2003) Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5419–5424
- Lee SK, Kim JH, Lee YC et al (2000) Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor- κ B, and serum response factor. *J Biol Chem* 275:12470–12474
- Lee MH, Lu K, Hazard S et al (2001) Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 27:79–83
- Lee JH, Park SM, Kim OS et al (2009) Differential SUMOylation of LXR α and LXR β mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN- γ -stimulated brain astrocytes. *Mol Cell* 35:806–817
- Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB et al (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272:3137–3140
- Li N, Salter RC, Ramji DP (2011) Molecular mechanisms underlying the inhibition of IFN- γ -induced, STAT1-mediated gene transcription in human macrophages by simvastatin and agonists of PPARs and LXRs. *J Cell Biochem* 112:675–683
- Lu K, Lee MH, Hazard S et al (2001) Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet* 69:278–290
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835–839
- Marathe C, Bradley MN, Hong C et al (2006) The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages. *J Biol Chem* 281:32197–32206
- Meng ZX, Nie J, Ling JJ et al (2009) Activation of liver X receptors inhibits pancreatic islet beta cell proliferation through cell cycle arrest. *Diabetologia* 52:125–135
- Mitro N, Mak PA, Vargas L et al (2007) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445:219–223
- Moazed TC, Campbell LA, Rosenfeld ME et al (1999) *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Infect Dis* 180:238–241
- Molteni V, Li X, Nabakka J et al (2007) *N*-Acyliithiadiazolines, a new class of liver X receptor agonists with selectivity for LXR β . *J Med Chem* 50:4255–4259
- Morales JR, Ballesteros I, Deniz JM et al (2008) Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke. *Circulation* 118:1450–1459
- Naiki Y, Sorrentino R, Wong MH et al (2008) TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control *Chlamydia pneumoniae*-induced acceleration of atherosclerosis. *J Immunol* 181:7176–7185
- Nunomura S, Endo K, Makishima M et al (2010) Oxysterol represses high-affinity IgE receptor-stimulated mast cell activation in liver X receptor-dependent and -independent manners. *FEBS Lett* 584:1143–1148
- Ogawa S, Lozach J, Jepsen K et al (2004) A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14461–14466
- Ogawa S, Lozach J, Benner C et al (2005) Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122:707–721
- Palvimo JJ (2007) PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6):1405–1408
- Park MC, Kwon YJ, Chung SJ et al (2010) Liver X receptor agonist prevents the evolution of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatology* 49:882–890

- Pascual G, Fong AL, Ogawa S et al (2005) A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437:759–763
- Pascual-García M, Carbó JM, León T et al (2011) Liver X receptors inhibit macrophage proliferation through downregulation of cyclins D1 and B1 and cyclin-dependent kinases 2 and 4. *J Immunol* 186:4656–4667
- Paterniti I, Genovese T, Mazzon E et al (2010) Liver X receptor agonist treatment regulates inflammatory response after spinal cord trauma. *J Neurochem* 112:611–624
- Peet DJ, Turley SD, Ma W et al (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693–704
- Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y et al (2008) Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* 4:e1000204
- Plat J, Nichols JA, Mensink RP (2005) Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res* 46:2468–2476
- Poukka H, Karvonen U, Janne OA et al (2000) Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14145–14150
- Pourcet B, Feig JE, Vengrenyuk Y et al (2011) LXR α regulates macrophage arginase 1 through PU.1 and interferon regulatory factor 8. *Circ Res* 109:492–501
- Quinet EM, Basso MD, Halpern AR et al (2009) LXR ligand lowers LDL cholesterol in primates, is lipid neutral in hamster, and reduces atherosclerosis in mouse. *J Lipid Res* 50:2358–2370
- Repa JJ, Liang G, Ou J et al (2000a) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14:2819–2830
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA et al (2000b) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289:1524–1529
- Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C et al (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277:18793–18800
- Ricart BG, John B, Lee D et al (2011) Dendritic cells distinguish individual chemokine signals through CCR7 and CXCR4. *J Immunol* 186:53–61
- Ricote M, Villedor AF, Glass CK (2004) Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:230–239
- Schultz JR, Tu H, Luk A et al (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14:2831–2838
- Scott RS, McMahon EJ, Pop SM et al (2001) Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411:207–211
- Singh SB, Ondeyka JG, Liu W et al (2005) Discovery and development of dimeric podocarpic acid leads as potent agonists of liver X receptor with HDL cholesterol raising activity in mice and hamsters. *Bioorg Med Chem Lett* 15:2824–2828
- Sironi L, Mitro N, Cimino M et al (2008) Treatment with LXR agonists after focal cerebral ischemia prevents brain damage. *FEBS Lett* 582:3396–3400
- Smoak K, Madenspacher J, Jeyaseelan S et al (2008) Effects of liver X receptor agonist treatment on pulmonary inflammation and host defense. *J Immunol* 180:3305–3312
- Song C, Liao S (2000) Cholestenic acid is a naturally occurring ligand for liver X receptor alpha. *Endocrinology* 141:4180–4184
- Terasaka N, Hiroshima A, Koieyama T et al (2003) T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett* 536:6–11
- Terasaka N, Hiroshima A, Ariga A et al (2005) Liver X receptor agonists inhibit tissue factor expression in macrophages. *FEBS J* 272:1546–1556
- Tian S, Poukka H, Palvimo JJ et al (2002) Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J* 367(Pt 3):907–911
- Töröcsik D, Baráth M, Benko S et al (2010) Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *J Immunol* 184:5456–5465
- Torra IP, Ismaili N, Feig JE et al (2008) Phosphorylation of liver X receptor alpha selectively regulates target gene expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 28:2626–2636
- Traves PG, Hortelano S, Zeini M et al (2007) Selective activation of liver X receptors by acanthoic acid-related diterpenes. *Mol Pharmacol* 71:1545–1553
- Treuter E, Venticlef N (2011) Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochim Biophys Acta* 1812:909–918
- Ullrich JW, Morris R, Bernotas RC et al (2010) Synthesis of 4-(3-biaryl)quinoline sulfones as potent liver X receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 20:2903–2907
- Villedor AF, Hsu LC, Ogawa S et al (2004) Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17813–17818
- Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P et al (2009) The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30:575–579
- Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM et al (2000) Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 275:14700–14707
- Venticlef N, Jakobsson T, Ehrlund A et al (2010) GPS2-dependent corepressor/SUMO pathways govern anti-inflammatory actions of LXR-1 and LXRbeta in the hepatic acute phase response. *Genes Dev* 24:381–395
- Villablanca EJ, Raccost L, Zhou D et al (2010) Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 16:98–105
- Wagner BL, Villedor AF, Shao G et al (2003) Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol Cell Biol* 23:5780–5789
- Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA et al (2004) Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J Biol Chem* 279:9905–9911
- Wang YY, Dahle MK, Agren J et al (2006) Activation of the liver X receptor protects against hepatic injury in endotoxemia by suppressing Kupffer cell activation. *Shock* 25:141–146
- Wang D, Liu M, Wang Y et al (2011) Synthetic LXR agonist TO901317 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Int Immunopharmacol* 11:2098–2103
- Williams S, Bledsoe RK, Collins JL et al (2003) X-ray crystal structure of the liver X receptor beta ligand binding domain: regulation by a histidine-tryptophan switch. *J Biol Chem* 278:27138–27143
- Willy PJ, Umeson K, Ong ES et al (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9:1033–1045
- Yang C, McDonald JG, Patel A et al (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 281:27816–27826

Yu L, York J, von Bergmann K et al (2003) Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 278:15565–15570

Zelcer N, Hong C, Boyadjian R et al (2009) LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325:100–104