



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**Facultad de Medicina
Dpto. de Biología Molecular**

**BAMBI, UN INHIBIDOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE
TGF β , EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS
LINFOCITOS T-CD4⁺**

Directores:

Dr. Ramón Merino Pérez

Dr. Jesús Merino Pérez

**Tesis doctoral presentada por Jorge Postigo Fernández
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria
Santander, Febrero 2013**



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGIA DE CANTABRIA

Ramón Merino Pérez, Científico Titular del CSIC, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria-Sodercan, Profesor Asociado del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA: que D. Jorge Postigo Fernández, Licenciado en Biología ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “BAMBI, UN INHIBIDOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE TGF β , EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS LINFOCITOS T-CD4⁺”, cuya parte experimental se ha realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria.

Considero que los objetivos planteados están razonablemente desarrollados y fundamenta las conclusiones a las que se llega. Por lo tanto, el trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado por el interesado, al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 21 febrero de 2013

Ramón Merino Pérez

Ramón Merino
Científico Titular
Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria
merinor@unican.es

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA
Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n
39011 SANTANDER ESPAÑA
TEL.: 942 201956
FAX.: 942 201903



Jesús Merino Pérez
Catedrático de Inmunología
Dpto Biología Molecular (Facultad de Medicina)
Vicedecano de Posgrado, Facultad de Medicina
Universidad de Cantabria - IFIMAV
Tf: 942 201956 Faz: 942 201945
e-mail: merinoj@unican.es

Jesús Merino Pérez, Catedrático de Inmunología de la Universidad de Cantabria y Coordinador del grupo de investigación “Inmunopatología”

EXPONE:

Que ha llevado a cabo las funciones de DIRECTOR DE TESIS del Licenciado en Biología Jorge Postigo Fernández durante todos los periodos de su programa de DOCTORADO en el Programa Interdepartamental Biología Molecular y Biomedicina. Durante este periodo ha desarrollado el proyecto de investigación titulado: “BAMBI, UN INHIBIDOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE TGF β , EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS LINFOCITOS T-CD4⁺” bajo la dirección científica del Dr Ramón Merino Pérez, Científico Titular del CSIC, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, y Profesor Asociado del Dpto de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria.

Lo que hace constar, a efectos de admisión de la Tesis Doctoral, en Santander a ventiuno de febrero de dos mil trece.

Fdo: Jesús Merino Pérez

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que han permanecido a mi lado a lo largo de todo este camino, sois muchos los que habeis compartido mi vida, aunque sea por breves periodos de tiempo, pero a pesar de la distancia os llevo muy dentro, así que aunque no os nombre a todos, GRACIAS, GRACIAS de corazón.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis Directores de tesis, los Dres. Jesús y Ramón Merino, por la confianza depositada en mí desde el principio, sus palabras de aliento, sus valiosos conocimientos, experiencias y por su trato "*familiar*". Gracias.

Al Dr. Marcos López Hoyos y a todo su equipo de la unidad de Inmunología del Hospital Marqués de Valdecilla, en especial a David, Lorena, Iñaki y Carolina (quiero volver a coincidir con vosotros de congreso), Lorena que por fin escribimos!! Venga un último empujón!

Al Dr. Luis Buelta, por sus conocimientos anatomopatológicos y su buen humor.

Gracias a Marta y Eli del servicio de Citometría del HUMV, por los ratos interminables frente al "Sorter", las charlas, los bocadillos. Gracias chicas, sin vosotras esta tesis no hubiera sido posible.

Sobretudo GRACIAS a mis compañeros de laboratorio, los de ahora y los que han pasado por él: Claudio, Raquelina, Kawsar, Rosalía. Agradecer especialmente a Jovanna, por enseñarme todo esto y hacerme sentir a gusto desde el primer día. A Esther, por enseñarme a pensar y por tu amistad, nunca he conocido una persona más íntegra y fiel a sus principios. Inés, porque hablando contigo siempre me sacas una sonrisa, a ver si nos cruzamos más por la cuesta del hospital. A los que aún comparten conmigo laboratorio: A Iván, por tu buen humor y porque hacías falta en este grupo jeje. A María, imprescindible, por dejarme usar tu citómetro y mantener en orden este laboratorio. A Natalia por tu gran trabajo y simpatía, eres el alma del laboratorio, regresa pronto!! A Maigüi y Fernanda, por haber sido mis compis dentro y fuera del laboratorio durante tanto tiempo, por fin doctores! A los nuevos compis: Juanje, Thays y Pilar, habeis hecho que la parte final de esta tesis se me haga super divertida, gracias por esos momentos y mucha suerte! Y como no, dar las GRACIAS especialmente a Marcos, porque se me quedan cortas las palabras para agradecerle TODO lo que me has enseñado y lo que he aprendido contigo, sabes lo que significas para mí y por supuesto decir que esta TESIS también es tuya.

A todos los compañeros y amigos que he hecho en la Facultad de Medicina, que sois muchos, ya vosotros sabéis quiénes sois: mis geniales vecinos I@s Piero: Lorena, Ana, Paula, Berta, Javi, Adán, Chipi, Iñaki; los Bioquímicos: Javi, Fonso, La Maña, Juan, Rosa, Eva, Vero, Pampín, Cortiguera, Nuri (y Moro), Manu, Gabi, Lucía, Andrea,...; A los Genéticos, Zabala y de Matxalen: Raúl, Mapi, Alejandro, Sandra, Inma, María, Juanxo, Carlos, Raquel, Sheila, Ana, David, Lillo, Val, Delfina, Esther, Begoña, Gerardo, Laura, Lorena...; A los del piso de arriba: Rocío, Lolo, Nacho, Palanca, Endika, Vir, Saray, Irene, Paula, Patri, Lucía, Rebe, Vero, Reichel, Antonio, María Luisa, María, David, Cecilia, Raquel, Aquilino, Nieves...; Perdonad si me olvidé de alguien, GRACIAS A TODOS!!

Gracias a mis amigos de toda la vida, los que siempre han estado, los del pueblo, por esperarme, entenderme y por los buenos ratos juntos: Clarita, Chato, Vane, Rakel, Tito, María, Gusi, Seve, Zeto, Ana, Nieves, Alex, Fran, Natalia, Teje, Laura, Cris, Sandra y un largo etc.... Os quiero a todos!!!

Gracias a los amigos encontrados en las aventuras de mi vida y que siguen conmigo a pesar de todo: a mis melonas (Paula y Rosa), a los amigos que te llaman justo cuando lo necesitas: Lena, Anna, Andrey, Iván, Eli, Marta, Carlos, Marcos... A mis hermanas, aunque no de sangre, si de corazón (Javi y David); a mis compis de gym (David y Tere); a los chicos que me hacen reír y estar como en familia (Pedro, Claudio, Alberto, Alex, Angel, Iván, Sergio, Javi, Chisco, Silvia, Elena...).

Especialmente esta tesis se la debo a mi familia: a mis hermanos Rodrigo y Jesús, gracias por aguantarme, sois los mejores!! A mi tío Chus, por creer en mí y hacerme ver que puedo valer para esto, GRACIAS. David y Olatz, muchas gracias por todo lo vivido y lo que nos queda!! Mis primas Lara e Irene, que bien me lo paso siempre con vosotras, os llevo conmigo y sabeis lo que os quiero. Al resto de mi familia que es mucha y os tengo presentes a todos: a mis abuelas y abuelos también va por vosotros; a mis tíos y primos, en especial a “Polan” por estar siempre ahí y a “Sordo” por tus consejos y rarezas.

Por último se lo agradezco a mi padres, por quererme y apoyarme siempre, porque os debo todo lo que soy hoy y porque yo si que estoy orgulloso de vosotros.

GRACIAS.

A MI FAMILIA:

***Por aceptarme
y
quererme como soy***

*“Tratando de Valer
nos olvidamos de Ser”*

A. Jodorowsky

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	V
PRÓLOGO	1
I. INTRODUCCIÓN	7
1.- LINFOCITOS T-CD4⁺ Y SU DIVERSIDAD FUNCIONAL.....	7
1.1.- Paradigma Th1/Th2.....	8
1.2.- Células Th1.....	8
1.3.- Células Th2.....	10
1.4.- Células Th17.....	11
1.5.- Células Th9.....	14
1.6.- Células Th foliculares (Tfh).....	14
1.7.- Células T reguladoras.....	15
1.7.1.- Células Tregs naturales (nTregs).....	19
1.7.2.- Células Tregs inducidas (iTregs).....	20
1.7.3.- Células Tr1.....	25
1.7.4.- Células Th3.....	27
1.8.- Plasticidad Treg/Th17 o Th1/Th17.....	27
2.- LA INTERLEUCINA 2	30
2.1.- Sistema de señalización de la IL-2.....	30
2.2.- Regulación de la IL-2 y el IL-2R α	32
2.3.- La IL-2 en las células Tregs y en la plasticidad iTreg/Th17.	34
3.- LA FAMILIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-β	36
3.1.- Síntesis de TGF β s.....	37
3.2.- Activación de los TGF β s latentes.....	37
3.3.- Unión a los receptores de TGF β s.....	38
3.4.- Ruta canónica: Señalización por Smad2/3.....	39

3.5.- Rutas no canónicas: Rutas No-Smad	42
3.5.1.- Señalización a través de ERK.....	42
3.5.2.- Señalización a través de JNK/p38.....	42
3.5.3.- Señalización a través de Rho-like GTPasas.....	43
3.5.4.- Señalización a través de PI3K/AKT.....	44
3.6.- Regulación de la vía de señalización de TGFβ.....	44
3.7.- BAMBI (BMPs and Activin Membrane Bound Inhibitor)	48
3.8.- Papel relevante de TGFβ en el sistema inmune	50
3.9.- Señalización de TGFβ en la diferenciación de los linfocitos T-CD4 ⁺ a los subtipos funcionales Treg/Th17	52
4.- AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES	55
4.1.- Artritis reumatoide (AR)	56
4.2.- Artritis inducida por colágeno (CIA).....	56
II. OBJETIVOS	61
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
1.- Ratones	65
2.- Mantenimiento y manipulación de los animales.....	66
3.- Análisis de la fosforilación de Smad3 <i>in vitro</i>	67
4.- Caracterización fenotípica y genotípica	68
5.- Inducción y valoración clínica y radiológica de la artritis.....	70
6.- Procesamiento y estudio histológico de los tejidos.....	71
7.- Producción y Purificación de anticuerpos monoclonales (AcM)	71
8.- Tratamiento <i>in vivo</i> con anticuerpos monoclonales.....	72
9.- Obtención de muestras sanguíneas y suspensiones celulares.....	73
10.- Cuantificación de anticuerpos en suero. ELISA.....	74
11.- Caracterización de las poblaciones linfocitarias de los órganos linfoides	75
12.- Purificación celular	77

13.- Cultivos celulares	78
14.- Estudio de la expresión de citocinas y BAMBI por PCR cuantitativa	80
15.- Reactivos	83
16.- Análisis Estadístico	85
IV. RESULTADOS	89
1.- EXPRESIÓN E INDUCCIÓN DE BAMBI EN LINFOCITOS T-CD4 ⁺	89
2.- LOS RATONES DEFICIENTES EN BAMBI MUESTRAN UN AUMENTO EN LA SEÑALIZACIÓN POR TGFβ EN LINFOCITOS T-CD4 ⁺	90
3.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES LINFOIDES EN EL RATÓN BAMBI ^{-/-}	91
4.- CARACTERIZACION FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS Tregs EN EL RATÓN BAMBI ^{-/-}	95
5.- INCREMENTO EN LA SEÑALIZACIÓN POR IL-2 EN LOS LINFOCITOS T-CD4 ⁺ y Tregs DE LOS RATONES BAMBI ^{-/-}	96
6.- AUMENTO EN LA DIFERENCIACION <i>IN VITRO</i> DE LINFOCITOS Tregs EN LOS RATONES BAMBI ^{-/-}	99
7.- AUMENTO DE LA CAPACIDAD SUPRESORA DE LAS CÉLULAS Tregs DE LOS RATONES BAMBI ^{-/-}	102
8.- EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN BAMBI SOBRE LA DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> A LOS SUBTIPOS Th17 Y Th1	103
9.- LA DEFICIENCIA EN BAMBI INHIBE EL DESARROLLO DE ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO (CIA)	105
10.- LAS CELULAS T REGULADORAS Y EL TGFβ PARTICIPAN EN LA PROTECCION FRENTE AL DESARROLLO DE CIA DE LOS RATONES BAMBI ^{-/-}	112
V. DISCUSIÓN	121
VI. CONCLUSIONES	135
VII. BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXO: PUBLICACIONES DEL PERIODO DOCTORAL	169

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	Concepto
Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
Ag-Ac	Antígeno-Anticuerpo
AICD	Muerte celular inducida tras activación
APCs	Células presentadoras de antígeno
APC	Alofococianina
AR	Artritis reumatoide
AutoAc	Autoanticuerpo
BBS	Tampón borato salino
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	DNA codificante
CFA	Adyuvante completo de Freund
CFSE	Carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFDA-SE)
CIA	Artritis inducida por Colágeno (<i>Collagen-induced arthritis</i>)
CII	Colágeno bovino tipo II
c.p.m.	Cuentas por millón
CTLA-4	Antígeno leucocitario asociado a función citotóxica
DC	Célula dendrítica
DEPC	Dietil pirocarbonato
DN	(Timocitos) dobles negativos
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DP	(Timocitos) dobles positivos
DTT	Ditiotreitol
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental

ELISA	Enzimo-inmunoensayo
EMT	Transición Epitelio-Mesénquima
F1	Híbrido de primera generación
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Fluoresceína isotiocianato
GAPDH	Enzima Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
HA	Hemaglutinina
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
i.p.	Intraperitoneal
iTreg	Células T reguladoras inducidas
LAP	Proteínas asociadas a latencia
LES	Lupus eritematoso sistémico
LLC	Complejo grande de latencia
LTBPs	Proteínas de unión al TGF β latente
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mRNA	RNA mensajero
NGS	Suero normal de cabra
NK	Célula asesina natural
NMS	Suero normal de ratón
nTreg	Células T reguladoras naturales
OLS	Órganos linfoides secundarios
PARP	PoliADP-ribosa-polimera
pb	Pares de bases
PB	Azul pacífico
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina

PerCp	Peridin-clorofila α -proteína
PFA	Paraformaldehído
p.i.	Post-inmunización
PMA	Forbol 12-miristato 14-acetato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente
SAS	Sulfato amónico saturado
s.c.	Subcutáneo
SI	Sistema Inmune
SLC	Complejo pequeño de latencia
SP	(Timocitos) simples positivos
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TCR	Receptor antigénico de los linfocitos T
TGF	Factor de crecimiento tumoral
Th	Linfocitos T-CD4 ⁺ colaboradores o <i>helper</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TRADD	Dominio de muerte asociado a TNFRI
Treg	Células T reguladoras
U	Unidades
UT	Unidades de titulación
UV	Ultravioleta
WT	Cepa silvestre (<i>wild type</i>)

PRÓLOGO

Sistema inmunitario (SI) y respuesta inmune (RI)

Los seres vivos estamos constantemente expuestos a agresiones externas que pueden causar enfermedades. Para defendernos de ellas contamos con la existencia del sistema inmunitario (SI), cuya función fisiológica consiste en la defensa del cuerpo contra distintos microorganismos infecciosos.

El SI está compuesto por distintos tipos de células, dotadas de gran autonomía pero al mismo tiempo obligadas a establecer sinergias entre ellas. Su correcto funcionamiento, basado en una gran capacidad citotóxica, se sustenta en tres pilares: (1) identificar las situaciones de peligro, para saber cuándo deben activarse; (2) seleccionar las células más adecuadas para responder a cada agente agresor; y (3) minimizar el daño al propio organismo, regulando la intensidad de la respuesta y evitando agredir al propio organismo (tolerancia inmunológica).

Por ello el SI cuenta con la capacidad para discernir entre lo propio y lo ajeno, respondiendo únicamente frente a antígenos extraños, algo fundamental para mantener la tolerancia a los componentes del organismo bloqueando la respuesta dañina contra los auto-antígenos. Todo esto necesita de una regulación estricta donde participan múltiples tejidos, células y factores solubles de forma coordinada para mantener la homeostasis celular y prevenir un daño tisular o una patología autoinmune. Para ello la respuesta inmune (RI) consta de 2 tipos de mecanismos, innatos y adaptativos, en función de las estructuras de reconocimiento de los patógenos. La respuesta inmune innata (RII) reconoce patrones moleculares altamente conservados, comunes a unos grupos de patógenos. Así mismo, también es capaz de reconocer señales de peligro, provenientes mayoritariamente de células del entorno dañadas. Son respuestas rápidas y relativamente poco específicas, ya que sus células se activan ante múltiples estímulos y no se expanden clonalmente, sea cual sea el patógeno y el número de contactos previos. En la RII se incluyen todos los leucocitos sanguíneos a excepción de los linfocitos y constituyen la primera barrera defensiva, que también esboza el escenario para que la RII conecte con el otro brazo efector del SI.

El segundo brazo efector es la respuesta inmune adaptativa (RIA) o adquirida, que tiene especificidad para antígenos microbianos muy diversos, lo que garantiza

respuestas óptimas gracias al repertorio de receptores diferentes de linfocitos T y B producidos al azar que les permiten reconocer específicamente cualquier estructura molecular. El encuentro que se produce cuando los linfocitos T y B reconocen un antígeno (Ag) exclusivo provoca una expansión clonal de la célula específica de ese Ag, generando memoria inmunológica. Los procesos de diferenciación de los linfocitos T y B tienen un gran paralelismo a lo largo de su desarrollo, sin embargo entre ellos existen notables diferencias en la forma de reconocer el Ag y, por supuesto, en su función en la RI.

Los linfocitos T son las únicas células que maduran en el timo, donde adquieren su receptor antigénico (TCR: *T cell receptor*). También se distinguen de otras células de la RI por la forma de reconocer al antígeno: solo reconocen pequeños péptidos, procesados por la célula presentadora y mostrados en su membrana unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Distinguimos dos tipos de linfocitos T en base a las dos moléculas que acompañan al TCR y funcionan como correceptores: el CD4 y el CD8.

Las células T-CD8⁺ o células T citotóxicas (T_{CTL}) reconocen péptidos procedentes de proteínas sintetizadas por la propia célula presentadora (Ags endógenos) y presentados por moléculas MHC de tipo I. Son células eminentemente efectoras que participan en los fenómenos de citotoxicidad. Cuando un linfocito T_{CTL} reconoce un complejo Ag-MHC mata a la célula que lo presenta secretando factores citotóxicos (perforinas y granzimas) o interaccionando con proteínas de membrana de la célula diana capaces de activar rutas de apoptosis (Fas, TNFR1, etc). Las células T-CD8⁺ atacan principalmente a células infectadas por virus y tienen un papel relevante en la respuesta frente al trasplante alogénico.

Los linfocitos T-CD4⁺ (T_H) en cambio, reconocen péptidos procedentes de la degradación de proteínas fagocitadas (Ags exógenos), que les son presentados en moléculas MHC de tipo II. Estos linfocitos son los principales productores de las citocinas que controlan la activación del resto de componentes de la RI. Como se expone más adelante, se encargan de coordinar el patrón de activación de la RI junto a las células dendríticas (DCs). Aunque su función principal en la RI es la activación de otros tipos celulares, los linfocitos T_H pueden matar a otras células secretando granzimas o expresando ligandos pro-apoptóticos, como Fas-L y TRAIL que activan programas de apoptosis. No obstante, su capacidad citotóxica es mucho menor que la de los linfocitos T-CD8⁺. La activación de células T-CD4⁺ es crucial para que se inicie la RIA. Para ello necesita que otra célula le presente el Ag junto a moléculas MHC de clase II y, además, exprese las moléculas coestimuladoras B7-1 y

B7-2. Aunque todo este proceso de presentación pueden llevarlo a cabo los linfocitos B y los macrófagos, son las DCs las que lo hacen con mayor eficiencia. La activación del linfocito T-CD4⁺ conlleva una complejidad mucho mayor que la activación de las células de la RII. Esta complejidad encierra un eficaz mecanismo de seguridad, impuesto por el carácter autorreactivo de muchos linfocitos. Así, para que un linfocito T se active, se requieren tres tipos de señales, las cuales tienen lugar en la sinapsis inmunológica, zona de contacto entre las membranas del linfocito T y de la Célula Presentadora de Antígeno (APC).

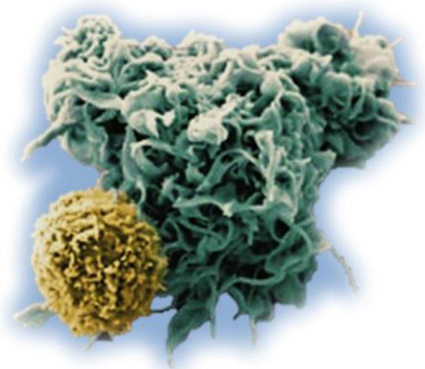
La primera señal (el Ag). En las células T es la interacción entre el TCR y el complejo Ag-MHC, y es la única de las tres señales que implica un reconocimiento específico. En los linfocitos B, la primera señal es el encuentro de la Inmunoglobulina (Ig) de membrana (su receptor) con el Ag en forma nativa.

La segunda señal (la coestimulación), es imprescindible para que el linfocito se active. Consiste en la interacción de la molécula CD28, expresada en todas las células T-CD4⁺, con B7-1 y/o B7-2, moléculas coestimuladoras expresadas en las APCs. En ausencia de coestimulo, la célula T entra en un estado de estupor denominado anergia y es incapaz de transformarse en célula efectora. Por todo ello, la necesidad de esta señal evita la activación de las células T autorreactivas en condiciones normales (ausencia de señales de alarma).

La tercera señal (las citocinas), además de poner en marcha la proliferación de los linfocitos (expansión clonal) dirige la diferenciación funcional de las células T CD4⁺ en cualquiera de sus fenotipos. Así mismo, determina la subclase de inmunoglobulinas que sintetizan los linfocitos B activados.

Se han descrito varios tipos funcionales de linfocitos T-CD4⁺ procedentes del linfocito T-CD4⁺ *naïve* (Th₀), que serán detallados en profundidad más adelante, aunque solo cuatro de ellos son aceptados por toda la comunidad científica (Th₁, Th₂, Th₁₇ y Treg). Su diferenciación depende de las dos últimas señales previamente mencionadas y se traduce, a su vez, en la producción de diferentes combinaciones de citocinas. No obstante, los linfocitos T-CD4⁺ son células con un notable grado de plasticidad, de tal manera que un fenotipo funcional puede variar si cambia el ambiente que rodea la interacción entre las APCs y las T-CD4⁺. El TGFβ es una de estas citocinas implicadas en la diferenciación linfocitaria, concretamente hacia los subtipos Th₁₇ y Tregulador, protagonistas del desarrollo de multitud de patologías autoinmunes. Así pues a lo largo de esta tesis se desgranará el papel de esta citocina clave sobre la diferenciación de estas subpoblaciones de linfocitos T-CD4⁺ y el desarrollo de autoinmunidad.

I.INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

1.- LINFOCITOS T-CD4⁺ Y SU DIVERSIDAD FUNCIONAL.

Los linfocitos T-CD4⁺ o colaboradores (**Th**) son los principales encargados de diseñar la estrategia de respuesta más adecuada en función del tipo de patógeno que centra la respuesta inmune y del escenario (tejido) en el que ésta tiene lugar. La activación de dichas células depende del reconocimiento por su TCR de antígenos presentados en moléculas MHC de tipo II por las APCs, (Zhu and Paul, 2008), y de la existencia de señales coestimuladoras, activadas por señales de alarma sobre las células presentadoras de antígeno (APCs). El término Th (T *helper* o colaboradores) derivó de la observación original de que estas células eran críticas en la respuesta humoral para ayudar a las células B a producir anticuerpos. No obstante, también se han visto implicadas en la inmunidad celular y en la hipersensibilidad retardada, caracterizada esta última por su habilidad para inducir respuestas inflamatorias mediadas principalmente por la activación de macrófagos. Cuando se activan, las células T-CD4⁺ se diferencian a células efectoras encargadas de la protección frente a patógenos ó a células reguladoras, que protegen de las respuestas inmunes a autoantígenos y de la propia intensidad de las respuestas frente antígenos exógenos. Si el control de la activación de estas células T-CD4⁺ no es correcto hay un elevado riesgo de desarrollo de enfermedades autoinmunes.

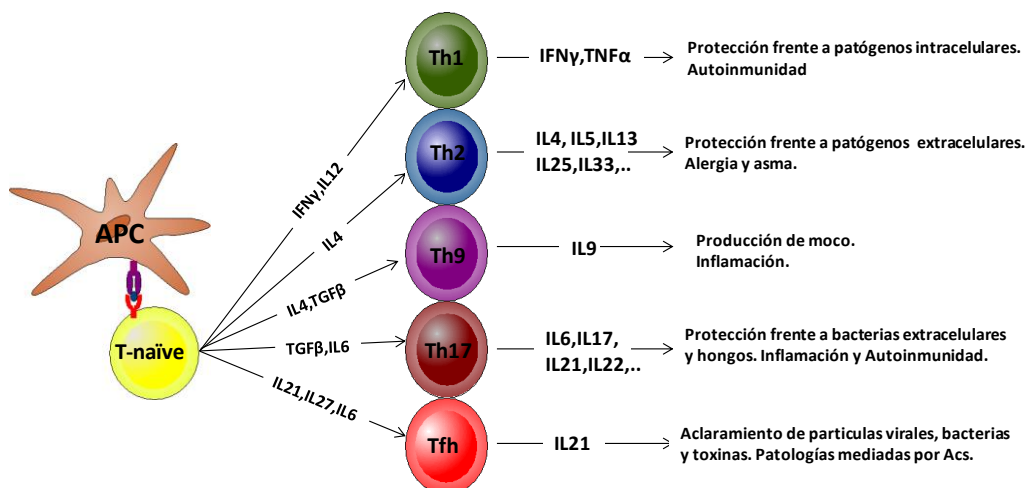


Figura 1. Subpoblaciones efectoras originadas a partir de células T-CD4⁺ naïve tras el contacto con el antígeno. Dependiendo de la adyuvancia de las sustancias co-expuestas con el antígeno y del estado de las células y citocinas en el ambiente, las células T-CD4⁺ naïve pueden diferenciarse a Th1, Th2, Th9, Th17 y Tfh. Según su patrón de expresión de citocinas, respuestas a quimiocinas e interacciones con otras células, estas subpoblaciones promueven diferentes tipos de respuestas inflamatorias y el desarrollo de autoinmunidad.

Durante mucho tiempo, la heterogeneidad de las células T-CD4⁺ se limitó a su división en células Th tipo 1 (Th1) y células Th tipo 2 (Th2), las cuales se habían considerado responsables no sólo de diferentes tipos de respuestas protectoras, sino también de la patogénesis de muchas enfermedades. Sin embargo, en los últimos años, nuestro conocimiento sobre la diferenciación de las células T-CD4⁺ se ha incrementado significativamente y nuevas subpoblaciones continúan descubriéndose (**Figura 1**).

1.1.- Paradigma Th1/Th2

La primera demostración de la existencia de al menos dos subpoblaciones diferentes de linfocitos T-CD4⁺ fue realizada por Parish y Liew (1972). Más tarde, Mossman y Coffman mostraron en ratones que esta heterogeneidad funcional se debía a patrones diferentes de producción de citocinas (Mossman *et al.*, 1986), descubrimiento que fue confirmado posteriormente en humanos (Del Prete *et al.*, 1991; Parronchi *et al.*, 1991). En base a esto, las células T-CD4⁺ humanas o murinas fueron clasificadas en ese momento en dos subpoblaciones principales, definidas como Th1 y Th2.

1.2.- Células Th1

Se caracterizan por la producción de niveles elevados de IFN γ junto con citocinas proinflamatorias como TNF α y TNF β , lo que da lugar a una activación del sistema inmune innato y de la inmunidad mediada por células, en la cual predominan los fenómenos citolíticos. Son responsables de la activación de fagocitos y de la producción de anticuerpos opsonizantes que facilitan la acción del complemento, jugando así un importante papel en la protección frente a patógenos intracelulares. Por el contrario, una actividad excesiva de las mismas contribuye a la aparición de dolencias inflamatorias y autorreactivas como la enfermedad inflamatoria intestinal (Davidson *et al.*, 1996) y la enfermedad injerto contra huésped (Hu *et al.*, 1999), así como desórdenes autoinmunes como la diabetes mellitus insulino-dependiente (Wang *et al.*, 1997) y la artritis reumatoide (Leung *et al.*, 2000).

Para una diferenciación funcional completa a este fenotipo celular es necesaria la colaboración entre el IFN γ y la IL-12 (Hsieh *et al.*, 1993; Seder *et al.*, 1993; Swihart *et al.*, 1995; Wenner *et al.*, 1996). La IL-12 producida por APCs tras el contacto con bacterias y virus induce a las NKs a producir IFN γ , y la unión de éste a

su receptor (IFN- γ R) en células T-CD4⁺ *naïve* da lugar a la fosforilación de STAT-1. El STAT-1 activo incrementa la expresión del factor de transcripción *T-bet*, fomentando la diferenciación a Th1 mediante la inducción de la expresión de IFN γ y de la subunidad específica del receptor de la IL-12 (IL-12R β_2) (Mullen *et al.*, 2001; Afkarian *et al.*, 2002). De este modo la célula se vuelve respondedora a la IL-12, activándose STAT-4 que estabiliza aún más el fenotipo Th1 (Szabo *et al.*, 1997) (**Figura 2**). En la última fase de diferenciación también se incrementa la expresión del IL18R α , que requiere de la señalización a través de IL-12/STAT-4 y se potencia en presencia de IFN γ . Conjuntamente, IL-12 e IL-18 inducen la producción de IFN γ por las células Th1 en ausencia de estimulación a través de su receptor de células T (TCR). Esta producción de citocinas independiente de antígeno resulta importante para la amplificación de respuestas Th1 a través del reclutamiento de otras células Th1 preexistentes (Okazawa *et al.*, 2002; Smeltz *et al.*, 2002).

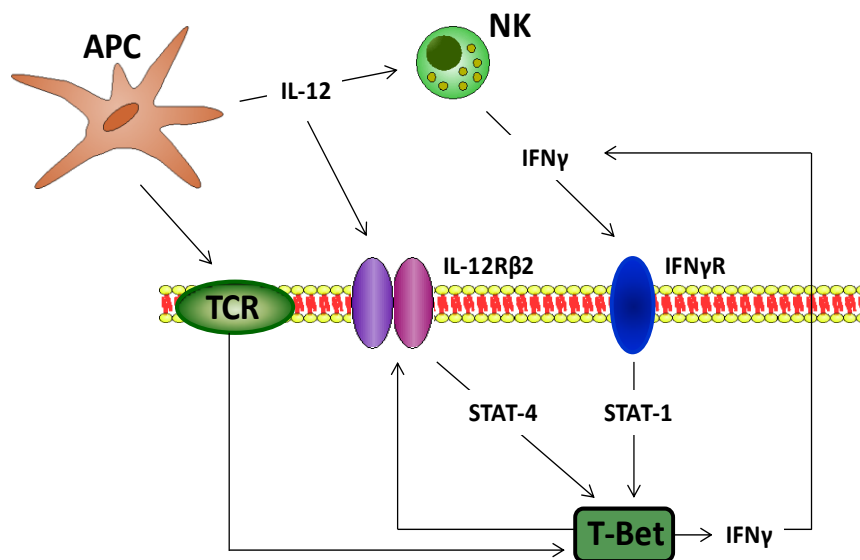


Figura 2. Citocinas y rutas moleculares que regulan la diferenciación Th1. La IL-12 producida por las APCs tras el contacto con bacterias y virus induce la producción de IFN γ por parte de las NKs, y la unión de este a su receptor (IFN- γ R) en células T-CD4⁺ *naïve* da lugar a la fosforilación de STAT-1. El STAT-1 activo incrementa la expresión del factor de transcripción *T-bet*, fomentando la diferenciación a Th1 mediante la inducción de la expresión de IFN γ y del IL-12R β_2 . De este modo la célula se vuelve respondedora a la IL-12, activándose STAT-4 que estabiliza aún más el fenotipo Th1.

1.3.- Células Th2

Son células caracterizadas por la producción de una combinación exclusiva de citocinas: IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31 e IL-33. Además, expresan citocinas compartidas con otros linajes celulares, como IL-2, IL-3, IL-9, IL-10, GM-CSF y TNF α . Se asocian con una respuesta de tipo humoral, estando involucradas principalmente en la protección frente a patógenos extracelulares de gran tamaño del tipo de parásitos helmintos. También se ha descrito que juegan un papel importante en la inmunidad asociada a las mucosas. Además, IL-4 e IL-13 son los principales mediadores del cambio de clase a IgE en las células B (Kopf *et al.*, 1993). La IgE se une al receptor Fc ϵ RI de basófilos y mastocitos, y su interacción con ligandos multivalentes induce entrecruzamiento de receptores Fc ϵ RI, lo que provoca la liberación, por parte de estas células, del contenido de sus gránulos citoplasmáticos, consistente en mediadores activos como histamina y serotonina, y la secreción de varias quimiocinas y citocinas como IL-4, IL-13 y TNF α . El resultado es la constricción del músculo liso, un incremento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de células inflamatorias (Larché *et al.*, 2006). La IL-5 regula positivamente un gran número de funciones de los eosinófilos, como su producción y liberación de la médula ósea, su activación y su supervivencia (Coffman *et al.*, 1989). Asimismo, la producción de IL-9 tras la infección por helmintos contribuye a la activación de mastocitos y a la producción de IgE características de estas infecciones (Faulkner *et al.*, 1998), además de inducir la producción de mucina por las células epiteliales (Longphre *et al.*, 1999). Sin embargo, un incremento aberrante en su respuesta da lugar a la aparición de patologías crónicas del tracto respiratorio, como asma atópico y alergias (Barrett and Austen, 2009).

La IL-4 es la citocina más potente, sino la única, en la inducción de la diferenciación de linfocitos CD4⁺ al perfil Th2 (Swain *et al.*, 1990) y su presencia, incluso a niveles muy bajos, es imprescindible para que ésta se desarrolle correctamente. Tras estimulación vía TCR y el receptor de la IL-4, se activa una cascada que lleva a la fosforilación de STAT-6, esencial para la inducción del factor de transcripción GATA-3, específico de las células Th2. A su vez, GATA-3 activa la producción de citocinas características de esta población, como IL-4, IL-5 e IL-13, al tiempo que regula a la baja STAT-4 e IL-12R β_2 (Szabo *et al.*, 1997; Zheng and Flavell, 1997), descritos anteriormente como inductores de la diferenciación a Th1. Además, el factor de transcripción c-Maf también contribuye a la diferenciación Th2, dado que activa la transcripción de IL-4 (Ho *et al.*, 1996) (**Figura 3**).

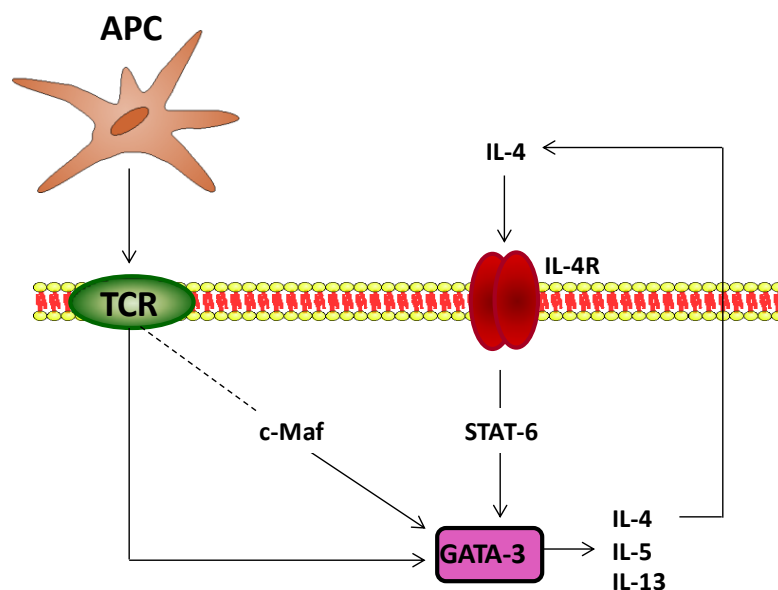


Figura 3. Citocinas y rutas moleculares que regulan la diferenciación Th2. La estimulación a través del TCR por APCs activadas tras el contacto con parásitos helmintos y la señalización vía IL-4-IL-4R, inducen una cascada de señalización que lleva a la activación de STAT-6 y GATA-3, factor de transcripción este último específico de esta subpoblación celular. GATA-3 a su vez activa la producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. El factor de transcripción c-Maf también contribuye a la diferenciación Th2 debido a que activa la transcripción de IL-4.

1.4.- Células Th17

Estudios relativamente recientes en dos modelos experimentales de enfermedad autoinmune, la artritis inducida por inmunización con colágeno de tipo II (CIA: *collagen-induced arthritis*) y la esclerosis múltiple secundaria a inmunización con proteína básica de mielina (EAE: *experimental autoimmune encephalomyelitis*), han demostrado la debilidad del paradigma Th1/Th2 como únicas formas de diferenciación de las células T-CD4⁺, sugiriendo la existencia de otras subpoblaciones funcionales de linfocitos T-CD4⁺. En ambas patologías experimentales, la severidad de la enfermedad se agravaba en ausencia de citocinas, receptores o factores de transcripción de tipo Th1 tales como IFN γ , IFN γ R, IL-12p35, IL12-R β_2 , T-bet o STAT-1 (Ferber *et al.*, 1996; Manoury-Schwartz *et al.*, 1997; Vermeire *et al.*, 1997; Gran *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Sin embargo, los ratones que carecían de la subunidad p40 de la IL-12, una subunidad compartida con la citocina IL-23 (Oppmann *et al.*, 2000), eran resistentes al desarrollo de estas patologías, y los deficientes en la subunidad p19 de la IL-23 estaban protegidos tanto frente a EAE como a CIA (Cua *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2003). Esta paradoja se resolvió cuando diferentes grupos identificaron una subpoblación diferente

caracterizada por la producción de IL-17A e IL-17F, por lo cual la llamaron Th17, y la necesidad de IL-23 para su mantenimiento y expansión (Oppmann *et al.*, 2000; Cua *et al.*, 2003; Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Más tarde se ha descubierto que también producen IL-21, IL-22 y GM-CSF además de IL-26 en humanos; y que expresan el receptor de quimiocinas CCR6 y su ligando CCL20 (Wilson *et al.*, 2007).

La IL-17A estimula las células endoteliales, epiteliales y fibroblásticas a producir otras citocinas y quimiocinas como IL-6, IL-8, GM-CSF y MCP-1, y sinergiza con otras citocinas proinflamatorias como el TNF α e IL-1 β para inducir la producción de quimiocinas. El resto de citocinas producidas por esta subpoblación contribuyen también a la activación de células mononucleares y por tanto inducen o mantienen el proceso inflamatorio crónico. Por ello, las células Th17 son cruciales en la defensa contra bacterias extracelulares y algunos hongos, frente a los cuales las respuestas Th1 y Th2 no resultan totalmente eficaces. Por otro lado, una respuesta exagerada de las mismas da lugar a la aparición de patologías inflamatorias y autoinmunes tanto en ratones como en humanos tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal (Lubberts *et al.*, 2004; McKenzie *et al.*, 2006; Aranami and Yamamura, 2008).

Para la diferenciación funcional a este fenotipo celular, tanto en ratones como en humanos, es imprescindible la presencia de **TGF β** e **IL-6** en el entorno de la célula T-CD4⁺ activa, las cuales actúan en conjunto y sin redundancia en sus funciones (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Manel *et al.*, 2008). El TGF β , citocina inmunomoduladora producida por una gran variedad de células, inhibe la producción de IL-2 generada por STAT-5 en células estimuladas a través de su TCR y también interfiere en la diferenciación hacia Th1 y Th2, debido a que inhibe la expresión tanto de T-bet como de GATA-3 (Gorelik *et al.*, 2000; Gorelik *et al.*, 2002). Por otro lado, hay que resaltar que el TGF β también induce la expresión de Foxp3, y por tanto de células T reguladoras (Tregs), y a ello se debe, como veremos posteriormente, la existencia de una relación tan estrecha entre estas dos subpoblaciones con funciones contrapuestas en el SI. Sin embargo, la presencia adicional de la citocina proinflamatoria IL-6 junto con el TGF β suprime la expresión de Foxp3 y por ende la generación de Tregs, y simultáneamente induce la producción de IL-17 y diferenciación hacia células Th17 (Bettelli *et al.*, 2006). A pesar de su importancia en ratones, ha existido cierta controversia sobre el papel de

TGF β en la diferenciación a Th17 en humanos. Inicialmente se pensó que era prescindible y que la diferenciación sería inducida por estimulación con IL-6 junto con otras citocinas como IL-1 β , IL-21 ó IL-23 (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Laurence and O'Shea, 2007), pero más tarde se ha publicado que a pesar de tener un papel diferente, también es imprescindible (Manel *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a). Recientemente se ha descrito en ratones que la IL-21, producida en gran cantidad por las células Th17, puede sustituir a la IL-6, utilizando una ruta alternativa en la diferenciación (Korn *et al.*, 2007). Estas citocinas proinflamatorias inducen la fosforilación de STAT-3 tras unión con su receptor lo que da lugar a la expresión de ROR γ t y ROR α (en ratones), factores de transcripción característicos de esta población (Ivanov *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008c). Parece que STAT-3 y ROR γ t cooperan uniéndose al promotor de la IL-17, e inducen su expresión (Chen *et al.*, 2006). La IL-21 producida por las propias células Th17, en presencia de TGF β induce Th17, creando un circuito de autoamplificación. Además tanto IL-6 como IL-21, en cooperación con el TGF β , inducen la expresión del receptor específico de la IL-23 (IL-23R), citocina producida por las APCs y que es imprescindible, a través de la activación de STAT-3, en el mantenimiento y la expansión de esta población celular (Veldhoen *et al.*, 2006) (**Figura 4**).

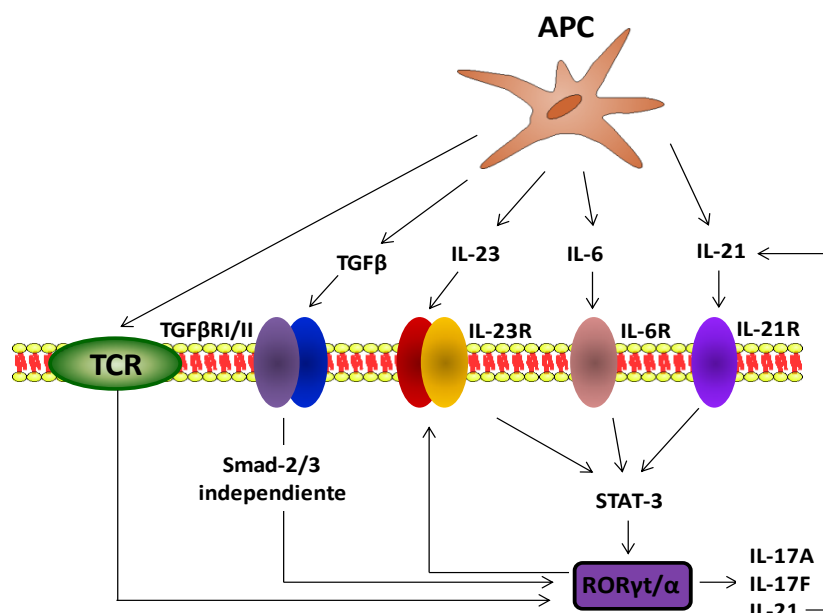


Figura 4. Citocinas y rutas moleculares que regulan la diferenciación Th17. Tras el contacto con bacterias extracelulares y hongos por las APCs se produce una activación de células T-CD4⁺ *naïve* a través del TCR, y en presencia de TGF β e IL-6 estas se diferencian a subpoblaciones Th17. La activación de rutas Smad-2/3 independientes por el TGF β y la fosforilación de STAT-3 por la IL-6, incrementan la expresión del factor de transcripción ROR γ t que, junto con STAT-3 induce la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 y el IL-23R. La IL-21 puede sustituir a la IL-6 en la activación de STAT-3. Con la expresión del IL-23R, la célula se hace respondedora a la IL-23, que a través de la fosforilación de STAT-3 estabiliza aún más el fenotipo Th17.

Recientemente se han visto evidencias de células productoras de IL17 que se desarrollan también en el timo de manera similar a como lo hacen las Treg naturales (nTreg) (Marks *et al.*, 2009).

Además de las anteriores, se han definido otras subpoblaciones de linfocitos T-CD4⁺, como las células Th9 y las células Tfh.

1.5.- Células Th9

Las células con fenotipo IL9⁺IL10⁺Foxp3⁻ pueden constituir una subpoblación de linfocitos T-CD4⁺ diferente, y se les ha denominado Th9. La aceptación de esta nueva subpoblación aun no tiene un respaldo general ya que, a pesar de que no expresan ninguno de los factores de transcripción asociados a otras subpoblaciones (T-bet, GATA-3, RORγt, Foxp3), no se ha identificado aún un factor específico de ellas (Dardalhon *et al.*, 2008; Veldhoen *et al.*, 2008). Se ha postulado que se diferencian a partir de células *naïve* o de aquellas que ya están comprometidas a fenotipo Th2, cuando se cocultivan en presencia de TGFβ1 e IL-4. El TGFβ1 hace que las células Th2 pierdan sus anteriores características, como la expresión de GATA-3 (Gorelik *et al.*, 2000) y de sus citocinas representativas, IL-4, IL-5 e IL-13, y comiencen a expresar IL-9. A pesar de que también producen elevadas cantidades de IL-10, no se ha descrito que posean propiedades reguladoras mientras que, por el contrario, sí se les atribuye un papel en la respuesta inflamatoria, ya que su transferencia adoptiva en ratones Rag-1^{-/-} induce colitis y neuritis periférica y la severidad de la misma se ve agravada si son co-transferidas junto con células efectoras CD4⁺CD45RB^{high} (Dardalhon *et al.*, 2008).

1.6.- Células Th foliculares (Tfh)

Estas células se podrían definir como aquellas que ayudan en el aclaramiento de partículas virales e infecciones bacterianas y sus productos (toxinas) a través de su capacidad de proporcionar ayuda a las células B en la producción de anticuerpos, ya que les posibilita llevar a cabo el cambio de clase de inmunoglobulina, la reacción de centro germinal y la maduración de afinidad, además de favorecer la formación de células B memoria de alta afinidad (Zhu and Paul, 2008). A pesar de que se han descrito como una población bastante heterogénea, presentan características específicas como la expresión del factor de transcripción Bcl-6, la ausencia de Blimp-1 y la secreción de IL-21 (Vogelzang *et al.*, 2008; Johnston *et al.*, 2009; Nurieva *et al.*, 2009), citocina esta última esencial en el desarrollo de sus funciones

y necesaria para su diferenciación. En la mayoría de los casos también expresan ICOS, PD-1 y CXCR5 que les dirige hacia el folículo linfoide (Yu *et al.*, 2009), además de presentar niveles reducidos de CD127 (IL7R), CD62-L (Lim and Kim, 2007; Fazilleau *et al.*, 2009) y CCR7 que les hace perder su afinidad por las zonas T del ganglio linfático (Yu and Vinuesa, 2010). Los requerimientos para su mantenimiento y diferenciación no están completamente esclarecidos pero incluyen la existencia de una interacción T-B mantenida (Haynes *et al.*, 2007) y de una señalización ICOS-ICOSL (Nurieva *et al.*, 2008), además de atribuirle un papel autocrino a la IL-21 secretada por las propias células. Recientemente se ha observado que la IL-27 incrementa la producción de IL-21 y la función de las células Tfh (Batten *et al.*, 2010). Su alteración puede desencadenar un amplio espectro de patologías mediadas por anticuerpos y una acumulación aberrante de estas células se ha asociado a lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjogren's y artritis autoinmune (Hutloff *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2008).

1.7.- Células T reguladoras

Hasta ahora hemos descrito diferentes poblaciones de linfocitos T-CD4⁺ que presentan un papel efector tanto en la protección frente a agentes externos, como en la inducción de patologías autoinmunes/inflamatorias en el caso de que respondan de una forma aberrante. Sin embargo, una de las principales funciones del SI es el mantenimiento del control de estas respuestas intentando establecer un equilibrio u homeostasis. Para ello, en el curso de la evolución de las especies se han desarrollado una serie de mecanismos reguladores englobados bajo el término de tolerancia inmunológica. Debido a la similitud molecular entre muchos de los autoantígenos con moléculas presentes en los patógenos, estos mecanismos están diseñados para permitir por un lado la presencia de un repertorio linfoide extremadamente diverso, y por el otro el silenciamiento de aquellos clones potencialmente peligrosos, sin inducir por eso un estado de inmunosupresión más generalizado. Este difícil equilibrio es vulnerable y la tolerancia inmunológica debe ser considerada por lo tanto como un proceso muy dinámico, que puede romperse y volver a instaurarse en el curso de diversas agresiones (infecciones, traumatismos, exposición a tóxicos, etc).

Entre los múltiples mecanismos encargados del mantenimiento de la tolerancia inmunológica destaca, por su carácter dominante y por actuar en la periferia sobre repertorios linfoides ya establecidos, la actividad de un grupo heterogéneo de células inmunosupresoras (Shevach, 2006) (**Figura 5**). La existencia de poblaciones de linfocitos con actividad supresora, capaz de inhibir respuestas inmunes tanto humorales como celulares, fue descrita por primera vez en los años 70 (Gershon and Kondo, 1970). Entonces se pensaba que era una población de linfocitos T-CD8⁺ supresores la que ejercía esta función biológica mediante la síntesis de factores solubles en situaciones antígeno-específicas. Sin embargo, debido a la carencia de marcadores específicos para identificar dichas células, este concepto de linfocitos T supresores fue abandonado e incluso estigmatizado por buena parte de la comunidad científica. Con la definición de las poblaciones Th1 y Th2 que controlaban diferentes tipos de respuestas inmunes y que se suprimían mutuamente surgió de nuevo el interés en el campo de la inmunorregulación. En paralelo, se observó que la eliminación del timo en ratones antes del 4º día de vida daba lugar a un amplio espectro de manifestaciones autoinmunes órgano-específicas. Como esto no ocurre si el timo se extirpa el séptimo día de vida, sugiere que las manifestaciones patológicas observadas son la consecuencia de la eliminación de una población celular con capacidad supresora que se genera en el timo durante los primeros días de vida (Kojima and Prehn, 1981). No fue hasta mediados de los 90 cuando finalmente se caracterizó por vez primera, tanto fenotípica como funcionalmente, una población de linfocitos T reguladores. El grupo del Dr Simon Sakaguchi identificó una población de linfocitos T-CD4⁺ que expresaban constitutivamente la cadena α del receptor de la IL-2, denominada **CD25**, y que eran anérgicos *in vitro* (Sakaguchi *et al.*, 1995). Esta población CD4⁺CD25⁺ (Treg) tenía un origen tímico y constituía aproximadamente un 10% de los linfocitos T-CD4⁺ circulantes en la sangre. Además del CD25 se han incorporado otros marcadores para identificar esta población, entre los que se encuentran CTLA-4, CD62L, CD69, GITR, CD127^{low} (Corthay, 2009), pero ninguno de ellos es suficientemente específico para discriminar las células Treg de las efectoras ya que estas últimas pueden expresar transitoriamente esos marcadores tras su activación.

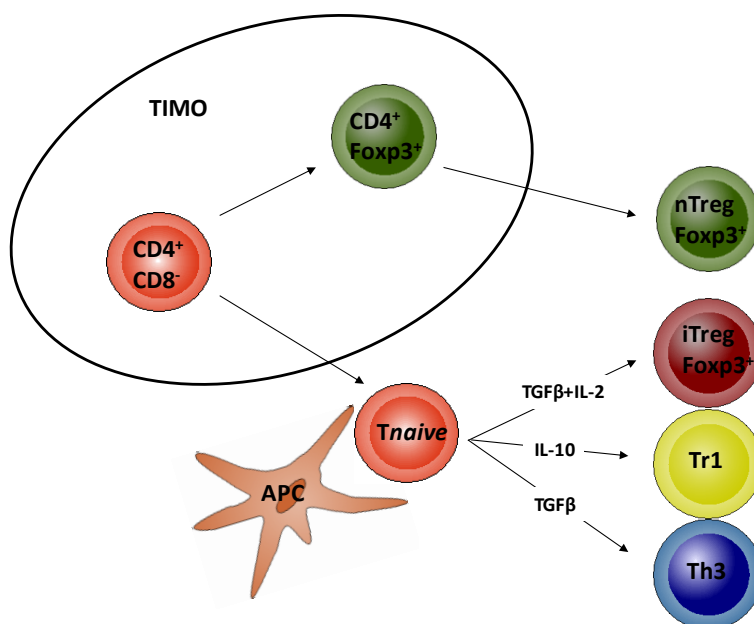


Figura 5. Subpoblaciones de células T-CD4⁺ reguladoras. Las diferentes poblaciones de células T-CD4⁺ con función supresora, se han clasificado utilizando diferentes parámetros como su origen, la expresión o no de Foxp3, y las citocinas que inducen su desarrollo y función.

El avance más importante en la caracterización de las células Treg ha sido la identificación del factor de transcripción **Foxp3**, el cual es esencial para su generación (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003). Este descubrimiento vino de la mano de la asociación entre la mutación del gen de Foxp3 y el síndrome IPEX (Sd. autoinmune ligado al cromosoma X) en humanos (Bennett *et al.*, 2001) o el ratón mutante con la anomalía denominada *scurfy* (Brunkow *et al.*, 2001). Estos ratones, al igual que en humanos, desarrollan una marcada proliferación linfocitaria y múltiples alteraciones autoinmunes órgano-específicas que provocan su muerte durante el primer mes de vida (Brunkow *et al.*, 2001). Al ser muy parecidas estas alteraciones a las observadas en los ratones neonatalmente timectomizados, se estableció la relación entre Foxp3 y las células Treg. De hecho uno de los nombres que se ha dado a Foxp3 es “*escurfina*”. Además, diversos estudios demostraron que la expresión de Foxp3 es específica de la población de células Treg, observándose únicamente una mínima expresión tras activación en las células T efectoras humanas (Hori *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003). Al mismo tiempo se observó que los humanos que padecían IPEX y los ratones con la mutación *scurfy*, o aquellos a los que se les había eliminado el Foxp3 eran incapaces de generar células Treg, mientras que la expresión exógena de esta molécula conllevaba un aumento en el número de células Tregs y la adquisición de propiedades supresoras de los linfocitos T-CD4⁺CD25⁻ (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et*

al., 2003). También se realizaron estudios en ratones quiméricos reconstituidos con una mezcla de células madre derivadas de ratones normales y deficientes en Foxp3 en relación 1:1, demostrando que el desarrollo de las células Tregs depende de la expresión de esta molécula ya que las células madre deficientes en Foxp3 fueron incapaces de aumentar la población reguladora (Fontenot *et al.*, 2003).

Resultados recientes relativos al estudio del papel real de Foxp3 en la diferenciación y función de las células Treg (Rudensky, 2011), indican que no es imprescindible para su supervivencia pero sí para el mantenimiento de su capacidad supresora. A pesar de que algunas de sus características, como el incremento en la expresión de CD25 y CTLA-4 o la disminución en la expresión del IL-7Ra (CD127), son conferidas a sus precursores previamente a la expresión de Foxp3, posiblemente por señalización a través del TCR y diferentes citocinas, Foxp3 potencia este patrón pre-existente y lo estabiliza (Gavin *et al.*, 2007). Estudios genómicos llevados a cabo tanto en células Treg como en células de hibridoma transfectadas con Foxp3, mostraron que esta molécula actúa como activador y represor transcripcional, y que regula de forma directa el 10-20% del total de genes modificados por su efecto (Marson *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007). Otro resultado importante ha sido la determinación de que Foxp3 no solamente es imprescindible para la diferenciación de estas células sino también para el mantenimiento de sus características, ya que la eliminación de un alelo condicional de esta molécula en células Treg totalmente diferenciadas resulta en una pérdida de su patrón de expresión génica y de su capacidad supresora. Además, tras la pérdida de Foxp3, las células ex-Treg adquieren la capacidad de producir citocinas activadoras de la respuesta inmune como IFN γ , IL-4 e IL-17, y recuperan el potencial patogénico de las células efectoras convencionales (Williams and Rudensky, 2007).

En los últimos años se ha descubierto la existencia de células reguladoras Foxp3⁺ generadas fuera del timo a partir de precursores CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻. Por ello, la población reguladora Foxp3⁺ se ha subdividido en dos grandes subgrupos: (1) las células reguladoras naturales (**nTreg**), si tienen un origen tímico, y (2) las células reguladoras inducidas (**iTreg**), si han sido generadas en la periferia.

1.7.1.- Células Tregs naturales (nTregs)

Esta subpoblación se desarrolla y adquiere su fenotipo supresor en el timo, migrando posteriormente a la periferia, donde son denominadas nTregs. La mayoría de estas células expresan constitutivamente la molécula CD25 y su desarrollo y función son dependientes de la transcripción de Foxp3.

Su selección tímica parece escapar al proceso convencional de diferenciación de las células T, ya que son seleccionadas al reconocer el MHC en presencia del péptido agonista, situación que normalmente provocaría su eliminación (Jordan *et al.*, 2001), por lo que estas células poseen un TCR auto-reactivo. También hay que mencionar que la interacción entre el TCR y su antígeno específico es esencial para la inducción de Foxp3 y la adquisición de su fenotipo supresor, ya que ratones RAG^{-/-} con un TCR transgénico para hemaglutinina (HA) no desarrollan células Tregs en ausencia del antígeno (Apostolou *et al.*, 2002). Así pues, nTregs en el timo tienen un fenotipo activado por la expresión elevada de CD25, también de GITR y niveles intermedios de CD44. Además, numerosos factores de transcripción activados a partir de la estimulación del TCR y el CD28 (NFAT, NF-κB, AP1, CREB, ATF) están implicados en la regulación de la expresión de Foxp3 a nivel transcripcional (Kim and Leonard, 2007). Por otro lado, las señales transmitidas a través de la unión de CD28 con sus ligandos B7.1/B7.2 son también relevantes en la formación del repertorio y tamaño del compartimento de esta población reguladora, dado que ratones deficientes en alguna de estas moléculas poseen un número muy disminuido de células Treg (Salomon *et al.*, 2000). Este fenómeno se ha atribuido al hecho de que los ratones CD28^{-/-} o B7.1/B7.2^{-/-} producen bajos niveles de IL-2 (Tang *et al.*, 2004). No obstante, las células reguladoras que se generan en ausencia de CD28 son funcionales. La señalización a través del TCR/CD28, parece ser insuficiente para inducir la expresión de Foxp3, por lo que sería necesaria una segunda señal mediada por la interacción **IL-2-IL-2R** (Bayer *et al.*, 2005). En este sentido se ha demostrado que ratones deficientes en IL-2 o su receptor sufren desórdenes inmunoproliferativos autoinmunes (Furtado *et al.*, 2002), los cuales pueden ser prevenidos tras la administración de Treg procedentes de un ratón capaz de responder a la IL-2. Estudios recientes sugieren un modelo de dos pasos para la diferenciación de las células Tregs donde, primero una fuerte señalización a través del TCR resulta en la sobre-regulación del CD25 haciendo al precursor de las Tregs sensible a la IL-2, que entonces induciría la expresión de Foxp3 de un modo

dependiente de STAT-5 (Lio and Hsieh, 2008) comprometiendo su diferenciación a nTreg.

TGF β , al que inicialmente se le había otorgado un papel imprescindible únicamente en la inducción de Foxp3 en células CD4⁺CD25⁻ periféricas, también desempeña un papel en el desarrollo de las células nTregs, ya que se ha observado una profunda disminución, aunque transitoria, en el número de timocitos Foxp3⁺ durante la primera semana de vida de ratones sometidos a una eliminación específica del TGF β RI en linfocitos T (Liu *et al.*, 2008). En concordancia con esta idea, se ha sugerido la existencia de una región intrónica en el gen *foxp3* a la que se podrían unir Smad3/NFAT, que funcionaría como amplificador y que tendría un papel importante en la expresión de Foxp3 tanto en el timo como en la periferia (Tone *et al.*, 2008). Por otro lado, también es posible que durante la diferenciación tímica, la señalización a través del TGF β afecte a la supervivencia de células Treg recién generadas o a la de sus precursores, más que a la propia expresión de Foxp3. A este respecto se ha publicado que TGF β inhibe la apoptosis de timocitos y Tregs induciendo la expresión de genes anti-apoptóticos y reprimiendo genes pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (Ouyang *et al.*, 2010). Estos descubrimientos implicarían diferentes requerimientos para la inducción de Foxp3 en el timo o en la periferia, y sugieren diferentes papeles biológicos de estas dos subpoblaciones celulares.

1.7.2.- Células Tregs inducidas (iTregs)

Estas células constituyen otro grupo dentro de la población de linfocitos Tregs y son generadas en la periferia a partir de células CD4⁺CD25⁻ *naïve* en presencia del antígeno y de ciertas citocinas (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Comparten varias características con las nTregs, como la supresión de la respuesta de una célula T efectora específica de un antígeno concreto, la anergia *in vitro* y también la expresión elevada de Foxp3 (Thorstenson and Khoruts, 2001).

Diversos estudios han demostrado que su generación *in vivo* se ve favorecida cuando existe una exposición continuada de un antígeno (Apostolou and von Boehmer, 2004) y tras la estimulación de los linfocitos T bajo condiciones inmunogénicas subóptimas, es decir, cuando la concentración del antígeno es baja y no hay señales de coestimulación (Kretschmer *et al.*, 2005). Además, siempre se produce en presencia de **TGF β** e **IL-2** (Wan and Flavell, 2006). Estas células iTregs aparecen en diferentes situaciones: (a) en ganglios mesentéricos, durante la

inducción de tolerancia oral (Coombes *et al.*, 2007); (b) en la lámina propia del intestino donde se diferencian continuamente en respuesta a la microbiota y a antígenos alimentarios (Sun *et al.*, 2007); (c) en tejidos donde existe una inflamación crónica (Curotto de Lafaille *et al.*, 2008); y (d) en tumores y tejidos trasplantados. El desarrollo de iTreg en el intestino se ve favorecido por la existencia de un microambiente característico, rico en TGFβ, y en el que coexisten células dendríticas CD103⁺ de la lámina propia que producen cantidades elevadas de ácido retinoico, junto con células T CD4⁺CD25⁻ (Coombes *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). La importancia del TGFβ se ha demostrado al observar que su neutralización *in vivo* inhibe el desarrollo de tolerancia oral e impide la diferenciación de iTregs antígeno específicas (Mucida *et al.*, 2005).

La estimulación *in vitro* de células T CD4⁺CD25⁻ *naïve*, a través de su TCR y en presencia de TGFβ e IL-2, consigue una óptima diferenciación a iTreg. En estas condiciones se induce la expresión de Foxp3 y las células adquieren un estado de anergia y actividad supresora *in vitro* y la capacidad de suprimir respuestas inflamatorias *in vivo* (Chen *et al.*, 2003). En la inducción de la transcripción de Foxp3 por TGFβ intervienen Smad-3 y NFAT a nivel del amplificador del gen *foxp3* (Josefowicz and Rudensky, 2009). Por su parte, la señalización a través de la IL-2 activa STAT-5, que se une al gen *foxp3* colaborando en su inducción (Burchill *et al.*, 2007) (**Figura 6**). Se ha observado que esta citocina es necesaria para la diferenciación pero no para el mantenimiento de la expresión de Foxp3 (Davidson *et al.*, 2007). Además, otros factores podrían promover o inhibir la inducción de iTregs. Las citocinas que inducen la diferenciación a otros fenotipos efectoras de células T-CD4⁺ (Th1, Th2, Th17) antagonizan con el desarrollo de células iTreg. El caso de la diferenciación a Th17 es más especial ya que la presencia de la citocina IL-6 junto con el TGFβ, bloquea completamente la expresión de Foxp3, permitiendo la expresión de RORγt e induciendo la producción de IL-17a por las células Th (Bettelli *et al.*, 2006).

Sin embargo, aparte de las señales provenientes de estas citocinas, existen otros factores intrínsecos de la propia ruta de señalización de TGFβ que parecen desempeñar un papel importante en la decisión de una célula a diferenciarse a fenotipo Treg o Th17, actuando como un sensor molecular de la intensidad de señalización. En este sentido, nuestro grupo demostró recientemente que uno de estos mecanismos de este hipotético sensor molecular es el inhibidor de ciclo celular p27, que influencia positivamente la diferenciación de las células T-CD4⁺ hacia

linfocitos Tregs mediante el incremento en la señalización por los TGF β s (Iglesias *et al.*, 2013).

Debido a la igualdad fenotípica entre las células iTreg y nTreg, es difícil establecer su contribución relativa al número total y efectos de las células Foxp3⁺ en la periferia. Recientemente, el grupo de Ethan Shevach ha demostrado que *Helios*, un factor de transcripción miembro de la familia de *Ikaros* (Hahm *et al.*, 1998), se expresa en un 65% de las células reguladoras Foxp3⁺ del bazo en ratones y humanos, restringiéndose su expresión a la subpoblación nTreg (Thornton *et al.*, 2010). Este descubrimiento permitiría estudiar la aportación de cada uno de los subtipos de células Treg en el mantenimiento de la homeostasis linfocitaria y en la protección frente a agentes externos y el desarrollo de autoinmunidad, aunque si es cierto que recientemente otro grupos atribuyen más la presencia de este marcador a un estado de activación celular (Akimova *et al.*, 2011). A pesar de ello, siguen existiendo otros marcadores de células Treg como la Neuropilina-1 o LAG-3 (Yi *et al.*, 2006).

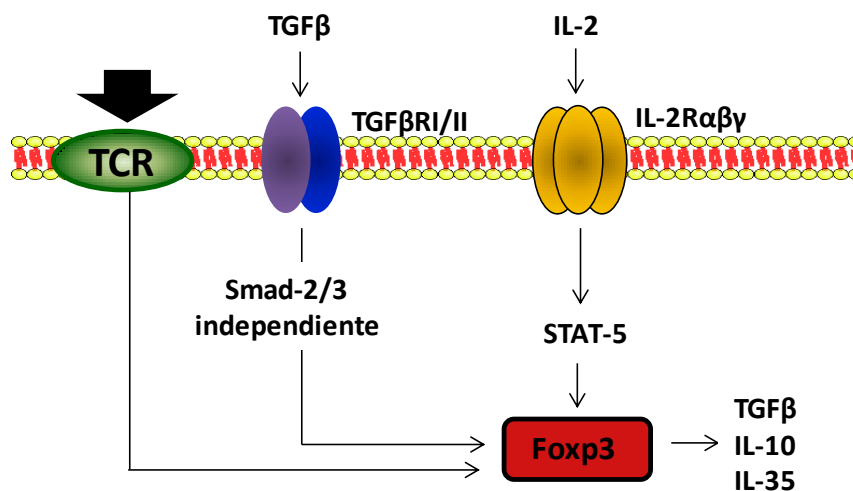


Figura 6. Citocinas y rutas moleculares que regulan la diferenciación iTreg a partir de células T-CD4⁺ naïve *in vitro*. Con la estimulación de células T-CD4⁺ naïve a través del TCR y en presencia de TGF β e IL-2 se consigue una óptima diferenciación a iTregs mediante la inducción de Foxp3, factor de transcripción característico de esta población. El TGF β activaría rutas Smad-2/3 dependientes provocando la colaboración de Smad-3 y NFAT sobre el amplificador del gen de *foxp3*. Por su parte, la señalización a través de IL-2 activaría STAT-5 que se uniría también al gen de *foxp3* colaborando con su inducción.

Los mecanismos por los cuales las células Treg llevan a cabo su acción supresora aún no han sido esclarecidos completamente. Esta acción podría depender del contacto directo célula-célula o estar mediada por factores solubles

liberados al medio, los cuales actuarían directamente sobre las células efectoras o indirectamente, interfiriendo las señales coestimuladoras de las APCs (Shevach, 2009).

A continuación se describen las principales rutas de supresión celular conocidas hasta el momento:

A.- Consumo de IL-2. Algunos estudios han demostrado que las células Tregs llevan a cabo su efecto supresor mediante la inhibición de la inducción del mRNA de la IL-2 en las células respondedoras (Thornton and Shevach, 1998), lo que provoca una parada en el ciclo celular en la fase G₀/G₁. Por ello uno de los mecanismos de supresión que se ha propuesto es que las células Treg compiten con las efectoras por la IL-2, consumiendo esta. Como consecuencia de ello, se inhibe la proliferación de los linfocitos T efectoras y se pone en marcha un mecanismo de apoptosis dependiente de la molécula pro-apoptótica Bim (Pandiyan *et al.*, 2007).

B.- Producción de citocinas supresoras. Estudios *in vivo* también han mostrado la importancia de la producción de citocinas supresoras solubles por las células Tregs, las cuales inhibirían a las células efectoras. Las citocinas con un efecto supresor mas contrastado son el TGFβ y la IL-10. A ellas se ha unido más recientemente la IL-35, una citocina inhibitoria perteneciente a la familia de la IL-12 (Hawrylowicz and O'Garra, 2005; Collison *et al.*, 2007). En el caso del TGFβ, a pesar de que juega un papel imprescindible en la inducción de células Treg, tanto *in vivo* como *in vitro* (Chen *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008), su papel como molécula mediadora de la supresión es controvertido. La mayoría de los estudios han demostrado que no es relevante en la supresión ejercida por las células Tregs *in vitro* (Piccirillo *et al.*, 2002), pero sí que se ha visto implicada en una amplia variedad de modelos de regulación mediada por células Tregs *in vivo* (Huber *et al.*, 2004; Gil-Guerrero *et al.*, 2008). No obstante, a día de hoy no se conoce si actúa como un mediador de la regulación sobre poblaciones efectoras, o como un factor de crecimiento y/o diferenciación para esta población reguladora. Cabe la posibilidad de que la forma inactiva del TGFβ (unida al péptido LAP), ligada a la membrana de las células Tregs activadas pudiera convertirse en su forma activa y liberarse directamente sobre las células efectoras por un mecanismo dependiente de contacto celular, ejerciendo así su actividad supresora sobre ellas (Nakamura *et al.*, 2001).

C.- Secreción ó expresión de moléculas de superficie. Otra molécula que también podría jugar un papel en la interacción de la población reguladora con células T

efectoras o las APCs es la *Galectina-1*, miembro de una familia altamente conservada de proteínas de unión a β -galactosidasas, que podría actuar como una citocina soluble o vía contacto celular. Su expresión en Tregs se incrementa mucho tras estimulación a través del TCR y su bloqueo específico utilizando un anticuerpo monoclonal revierte el efecto supresor de las células CD4⁺CD25⁺ en humanos (Garin *et al.*, 2007).

D.- Citolisis. Otro mecanismo de acción potencial de las Tregs podría ser la lisis de las células que participan en una respuesta inmune concreta, como las APCs, mediante la expresión de granzima y perforina. En este caso la célula inhibidora es una célula supresora citolítica (Grossman *et al.*, 2004; Gondek *et al.*, 2005). También se han puesto en evidencia células supresoras con capacidad de matar a células T-CD8⁺ a través de interacciones FasL-Fas (Strauss *et al.*, 2009).

E.- Modulación de la actividad de las APCs. Además de un efecto directo, las células Tregs podrían ejercer sus funciones supresoras a través de las APCs, impidiendo o disminuyendo la activación que éstas ejercen sobre la población de células T efectoras:

1.- Uno de los mecanismos más estudiados es la interacción entre la molécula CTLA-4, expresada constitutivamente por las células Treg, con sus ligandos CD80 y CD86 (B7.1 y B7.2) de las DCs (células Dendríticas). Por un lado, las células Treg envían señales inhibitorias a las DC a través de CTLA-4, provocando una regulación a la baja de las moléculas de coestimulación CD80 y CD86, con la consecuente disminución de su capacidad de activar a las células T efectoras (Serra *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 2004). Por otro lado, inducen en las DC la expresión de Indolamina 2,3-dioxigenasa, molécula que cataboliza la conversión del triptófano en kinurenina y otros metabolitos que poseen un potente efecto inmunosupresor en las células de su entorno (Mellor *et al.*, 2004). También es posible que CTLA-4 interaccione directamente con las moléculas CD80 y CD86 de las células T activadas, induciendo su inactivación (Paust and Cantor, 2005).

2.- Otro antígeno de superficie que puede ejercer un papel en la supresión de las DC por parte de las Treg es LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*, CD223), homólogo del CD4 que se une a moléculas de MHC de clase II con alta afinidad. Esta unión, en DC inmaduras, induce una señal inhibitoria, suprimiendo su maduración y capacidad inmunoestimuladora (Liang *et al.*, 2008). En humanos,

debido a que las células T activadas también pueden expresar moléculas de MHC de clase II, el efecto supresor de LAG-3 sobre ellas podría ser directo.

3.- La molécula FGL2 (*fibrinogen-like protein 2*), miembro de la superfamilia del fibrinógeno, es secretada por las células Treg en un ratio unas 6 veces mayor que en las T efectoras y puede afectar a la función de las DC al unirse a su receptor FcγRIIB induciendo una disminución en la expresión de CD80 y CD86 (Shalev *et al.*, 2008), con la consecuente disminución de su capacidad para activar a las células T efectoras.

4.- La *Neuropilina* (Nrp-1) promueve interacciones de larga duración entre células Tregs y las DC inmaduras (Sarris *et al.*, 2008) por lo que su expresión preferencial en células CD4⁺CD25⁺, puede aportarles una ventaja sobre las células T-CD4 *naïve* en la modulación de la función de las DC.

5.- Por último, otro posible mecanismo sería la inactivación catalítica del ATP extracelular (que funciona como indicador de daño celular) por parte de CD39. CD39 se expresa en todas las células reguladoras murinas y en un 50% en humanos. Es una ectoenzima que hidroliza el ATP o ADP a AMP, disminuyendo la estimulación de las DC y a su vez la acción de estas activando a las células T efectoras (Borsellino *et al.*, 2007).

Diferentes estudios han indicado la existencia de una disminución en el número y función de las células Tregs en individuos con enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, diabetes, psoriasis, miastenia gravis, sarcoidosis, enfermedad injerto contra huésped, esclerosis múltiple, gastritis, lupus eritematoso y alergia (Brusko *et al.*, 2008). Por ello, la investigación en nuevas modalidades de tratamiento debería ser considerada, incluyendo la manipulación de las Treg en el desarrollo de opciones terapéuticas para esas condiciones.

Además de las células Foxp3⁺, se han descrito otras subpoblaciones de células T-CD4⁺ que ejercen un papel regulador en la periferia, tal es el caso de las células Tr1 y las Th3.

1.7.3.- Células Tr1

Son células T-CD4⁺ generadas en la periferia tras el encuentro con el antígeno. Secretan altos niveles de IL-10 y moderados de TGFβ, lo que les confiere capacidad de suprimir respuestas inmunes patológicas, tanto Th1 como Th2 *naïve* o memoria, en contextos de trasplante, alergia o autoinmunidad (Roncarolo *et al.*, 2001).

También secretan IL-5 y en menor cantidad IFN γ e IL-2, pero nunca IL-4. Las células Tr1 activadas se caracterizan además por la expresión del IL-2/IL-15R α junto con los constitutivamente presentes IL-2/IL-15R $\beta\gamma$. También expresan marcadores de activación como CD40L, CD69, CD28 y CTLA-4, estando este último implicado en la producción de TGF β , ya que la secreción de esta citocina es bloqueada por el anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 (Kitani *et al.*, 2000). Se ha descrito que en reposo las células Tr1 humanas expresan un vasto repertorio de quimiocinas, ya sean exclusivas de esta población, como la CCR7 implicada en la migración a los ganglios linfáticos, o compartidas con las células Th1 (CXCR3, CCR5) o las Th2 (CCR3, CCR4 y CCR8) (Sebastiani *et al.*, 2001). Aunque poseen una capacidad supresora similar a las CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, no expresan Foxp3 de forma constitutiva (Vieira *et al.*, 2004), si bien lo pueden hacer tras activación. Este hecho sugiere que son funcionalmente diferentes y que pueden representar otro estrato de regulación de la respuesta inflamatoria. Así, estudios *in vitro* han demostrado que las células Tregs pueden actuar sobre las células T *naïve* induciendo su diferenciación a Tr1.

La población Tr1 puede ser generada *in vivo* e *in vitro* tras estimulación de células T *naïve* con el antígeno, en presencia de elevadas cantidades de IL-10 (Roncarolo *et al.*, 2001). También podrían diferenciarse a partir de células Th1 ó Th2 tras estimulación crónica, de forma que éstas mantienen solamente la expresión de IL-10 y no del resto de citocinas (Hawrylowicz and O'Garra, 2005). Dependiendo del sistema experimental utilizado para su inducción, su patrón de expresión de TGF β , IFN γ e IL-5 puede variar ligeramente, pero siempre mantienen una expresión alta de IL-10 y niveles indetectables de IL-4. También se ha observado que la estimulación repetida de células T-CD4⁺ sanguíneas con DC inmaduras genera células Tr1 y lo mismo puede suceder al ser estimuladas con DC tolerogénicas. Proliferan pobremente tras la activación policlonal por el TCR o tras activación antígeno específica debido a la producción autocrina de IL-10, sin embargo, cuando son estimuladas con IL-15 proliferan en ausencia de activación de su TCR (Bacchetta *et al.*, 2002).

En cuanto al tipo de supresión inducido por las células Tr1, no está claro si implica una modulación de las APCs, de las células T o de ambos tipos celulares, pero tiene lugar a través de la liberación de las citocinas inmunomoduladoras IL-10 y TGF β , tanto *in vivo* como *in vitro* (Battaglia *et al.*, 2006). La activación de las células Tr1 es específica de antígeno, pero al igual que ocurre con las Th3, pueden ejercer una supresión colateral mediada por la liberación local de IL-10 (Groux, 2003).

1.7.4.- Células Th3

Esta población reguladora fue identificada originariamente en estudios de tolerancia oral en ratones. Son células T-CD4⁺ que no expresan Foxp3, y ejercen su acción principalmente a través de la secreción de TGFβ (Chen *et al.*, 1994) aunque también producen cantidades variables de IL-4 y/o IL-10. En roedores se ha puesto en evidencia su eficacia en la supresión de varios modelos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la CIA, EAE y colitis (Thompson *et al.*, 1993; Groux *et al.*, 1997), mientras que en humanos también se han descrito células con este fenotipo en infecciones crónicas por helmintos (Doetze *et al.*, 2000).

Aunque su mecanismo de inducción no está totalmente esclarecido, mediante experimentos *in vitro* se ha demostrado que se inducen a partir de precursores *naïve* en presencia de TGFβ y que su expansión se ve favorecida con la presencia de IL-4, IL-10 y anti-IL-12 (Weiner, 2001a). *In vivo* se originan a nivel intestinal tras la administración continuada por vía oral de bajas dosis del antígeno y proliferan dependiendo de su presencia; sin embargo su efecto supresor no es antígeno-específico. También se ha descrito que podrían generarse en otros sistemas, pero su desarrollo es principalmente a este nivel, debido a su característico ambiente inmunológico, rico en TGFβ y con una clase especial de células presentadoras de antígeno. Una vez diferenciadas a Th3, las células T-CD4⁺ se expandirían en presencia de IL-10, induciéndose la expresión de CTLA-4 en la superficie celular, lo que podría contribuir a la inducción de la producción de TGFβ (Chen *et al.*, 1998). Además, es posible que en estas células se induzca la expresión de moléculas de adhesión como αEβ7 para residir en la mucosa digestiva (Weiner, 2001b).

Presentan la capacidad de suprimir a células Th1 y Th2, posiblemente por un mecanismo dependiente de las DC, ya que suprimen su capacidad estimuladora y las convierten en tolerogénicas. Al mismo tiempo, las células Th3 podrían ejercer un papel más relevante en la regulación y homeostasis de las células T, debido a la influencia del TGFβ sobre la actividad funcional de otros tipos celulares (Letterio and Roberts, 1998).

1.8.- Plasticidad Treg/Th17 o Th1/Th17

Lejos de lo que se pensaba años atrás cuando se postulaba que la diferenciación de las células T-CD4⁺ *naïve* a diferentes subtipos funcionales era un evento irreversible, actualmente se están acumulando evidencias de que particularmente

las iTregs y Th17 manifiestan un marcado grado de plasticidad entre ellas. La expresión de Foxp3 por parte de las iTregs o de IL-17 por las Th17 no es estable y existe un amplio grado de flexibilidad en sus opciones de diferenciación (Zhou *et al.*, 2009).

La existencia de una relación entre estos dos linajes celulares es clara, ya que como se ha citado anteriormente, su diferenciación en ambos casos requiere de la presencia inicial de TGF β . En respuesta a la estimulación de las células T-CD4⁺ *naïve* a través del TCR, y en presencia de TGF β , se produce una inducción transcripcional tanto de Foxp3 como de ROR γ t, lo que indica que estas células tienen la potencialidad de diferenciarse hacia linfocitos Th17 o Treg dependiendo sobre todo de otras citocinas presentes en el entorno (Veldhoen *et al.*, 2006). Resultados obtenidos por el grupo de Zhou, muestran que las células que coexpresan ROR γ t y Foxp3, producen, sin embargo una cantidad inapreciable de IL-17 (Zhou *et al.*, 2008), lo que sugiere que Foxp3 antagoniza con la producción de IL-17 dependiente de ROR γ t por un mecanismo celular intrínseco. Una explicación plausible, es que estos dos factores de transcripción pueden interactuar entre ellos en el contexto de grandes complejos nucleares, a través de los cuales Foxp3 regula la expresión de ROR γ t de un modo similar al descrito en la relación entre Foxp3 y ROR α (Du *et al.*, 2008). En presencia de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-21, IL-23) y bajas concentraciones de TGF β se induce la expresión de ROR γ t, mientras que tanto la expresión como la función del Foxp3 son inhibidas. De esta forma se libera la represión en la actividad de ROR γ t ejercida por Foxp3, lo que favorece la diferenciación a linaje Th17, y por tanto, la producción de IL-17. Por el contrario, en ausencia de citocinas proinflamatorias, elevadas concentraciones de TGF β son óptimas para la expresión de Foxp3 y así dirigir el balance hacia la diferenciación a Treg (Zhou *et al.*, 2008). Este cambio en el balance hacia Treg se ve incrementado con la citocina IL-2 y el ácido retinoico (Laurence *et al.*, 2007; Mucida *et al.*, 2007).

También se han descrito otros factores de transcripción que intervienen en la modulación de este balance ROR γ t-Foxp3. Así, para la diferenciación a Th17 son esenciales IRF4 y STAT-3, tanto *in vivo* como *in vitro* (Brustle *et al.*, 2007). Por otro lado, Runx1 puede cooperar con ambos factores, lo cual implica que la plasticidad funcional de las células que expresan tanto Foxp3 como ROR γ t puede ser gobernada por la capacidad de Runx1 de activar uno de ellos (Zhang *et al.*, 2008).

Además de esta potencialidad de los precursores de las células Tregs y Th17 de diferenciarse a ambas tipos funcionales, también se ha observado que células

totalmente diferenciadas a uno de los fenotipos pueden convertirse en el contrario si se altera el ambiente en el que se encuentran (Hori, 2010). La primera aportación a la idea de la existencia de plasticidad en las Tregs fue proporcionada por los grupos de Xu y Yang, que descubrieron que una fracción de las células Treg localizadas en la periferia, perdía la expresión de Foxp3 y producía IL-17 tras su estimulación *in vitro* con IL-6 (Xu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008b). Otros grupos observaron que varias semanas después de la transferencia de células Tregs periféricas a ratones linfopénicos, la expresión de Foxp3 y de otros marcadores de superficie típicos de células Treg se había perdido en el 50% de ellas, coincidiendo con la pérdida de su capacidad supresora *in vitro*. Además, muchas de estas que experimentaron un cambio fenotípico y funcional producían citocinas características de células T efectoras, como IFN γ , IL-2 e IL-17, mientras que otras mantenían memoria de su previa expresión de Foxp3, y readquirían ésta tras estimulación o transferencia secundaria a ratones linfopénicos (Duarte *et al.*, 2009; Komatsu *et al.*, 2009).

Actualmente existen dos teorías que intentan explicar esta aparente plasticidad. La primera se inclina por la existencia de una reprogramación en el sistema de diferenciación celular, mientras que la segunda defiende la existencia previa de cierta heterogeneidad dentro de la población reguladora, con una subpoblación comprometida totalmente a este linaje y otra no tanto. Se ha descrito que la existencia de cambios epigenéticos se asocian a una expresión más estable de Foxp3 (Floess *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2010). Aunque cabe destacar que recientes trabajos vuelven a hablar de cierta estabilidad de esta población reguladora en respuestas *in vivo* (Rubtsov *et al.*, 2010).

También se ha observado cierta inestabilidad en el fenotipo de las células Th17. La detección de células IL-17⁺IFN γ ⁺ tanto bajo condiciones homeostáticas como inflamatorias (Wilson *et al.*, 2007), sugiere la existencia de una relación entre los programas de diferenciación a subpoblación Th1 y Th17. En contraste con suposiciones iniciales de un intermediario común, actualmente se piensa que estos dos tipos funcionales están conectados tras una diferenciación inicial a Th17. Células IL-17⁺ expandidas o generadas *in vitro* pueden ser polarizadas a Th1, y dicho cambio de fenotipo se ve facilitado por su expresión constitutiva de niveles basales del IL-12R β_2 (Annunziato *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). La estimulación con IL-12 e IL-23 en ausencia de TGF β regularía a la baja rápidamente la producción de IL-17, e induciría la expresión de IFN γ por un mecanismo dependiente de STAT-4 y T-bet. La adición al medio de TGF β exógeno, retrasaría este proceso aunque no lo

inhibiría completamente (Lee *et al.*, 2009). También se ha observado que células CD4⁺ diabetogénicas BDC2.5 polarizadas *in vitro* a fenotipo Th17, pierden la expresión de IL-17 y adquieren la capacidad de producir IFN γ después de su transferencia adoptiva a ratones NOD-SCID, causando destrucción de células β pancreáticas y diabetes (Bending *et al.*, 2009). La rápida transición de respuestas Th17 a Th1 podría representar un mecanismo de defensa del hospedador para controlar infecciones frente a microbios intracelulares.

2.- LA INTERLEUCINA 2

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina de 15.5 kDa que se secreta de forma soluble y que se descubrió en 1976 como factor de crecimiento de linfocitos T, gracias a su capacidad para estimular células T *in vitro* (Morgan *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1988). Hoy en día, gracias al uso de ratones deficientes para la IL-2 o su receptor, se sabe que es esencial para el mantenimiento de la homeostasis linfocitaria y especialmente en la tolerancia periférica ejercida por las células Tregs. (Malek *et al.*, 2008).

En estado basal, en los órganos linfoides secundarios la fuente principal de IL-2 son las células T-CD4⁺ (Malek *et al.*, 2008; Granucci *et al.*, 2001). Otras células productoras a niveles mucho menores son las NKTs, las NKs y los T-CD8⁺ (Yui *et al.*, 2004). Sin embargo, en el transcurso de una respuesta inmune, la producción de IL-2 por parte de las células T-CD4⁺ y T-CD8⁺ activadas aumenta muchísimo en las primeras horas y permanece elevada varios días en los órganos linfoides, donde es consumida localmente por las células T-CD4⁺ activadas y las células T-CD8⁺, pero principalmente por las Tregs que son las que mantendrán finalmente la homeostasis de la IL-2 (Sharma *et al.*, 2007).

Debido a estas acciones sobre el sistema inmune, la IL-2 se ha implicado en inmunoterapia, por ejemplo la administración de IL-2 recombinante induce la regresión de tumores y melanomas en animales y en humanos (Rosenberg *et al.*, 2001), también forma parte de los tratamientos en pacientes con HIV/AIDS para mantener unos números normales de células T CD4⁺ (Paredes *et al.*, 2002).

2.1.- Sistema de señalización de la IL-2

En células T, la producción de IL-2 se induce a raíz de la activación de las mismas en presencia de antígeno, lo que las permite proliferar y diferenciarse. Sin

embargo, una estimulación persistente a través de su TCR junto con señales a través de la IL-2 puede inducir la apoptosis mediada por Fas y FasL conocida como muerte inducida tras activación (AICD) (Lenardo *et al.*, 1991).

Esta citocina actúa específicamente sobre células que expresan los receptores para la IL-2. Estos receptores están compuestos por 3 cadenas peptídicas codificadas por 3 genes independientes: **IL-2R α** (CD25), **IL-2R β** (CD122) e **IL-2R γ** (CD132), ahora conocida como cadena común (γ_c) que forma parte de receptores para varias citocinas como la IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 o IL-21 (Noguchi *et al.*, 1993).

La combinación de estas cadenas define las clases de receptores en función de su afinidad por la citocina (Taniguchi and Minami, 1993). El receptor dimérico, de baja afinidad, está compuesto por la cadena β (CD122), que es compartida también por el receptor de la IL-15, y por la cadena γ (CD132). Este receptor necesita expresarse de una forma relativamente alta para que la célula pueda responder correctamente a la IL-2, debido a su menor afinidad, de hecho este receptor apenas es detectado en células T-CD4⁺ en reposo y se encuentra a niveles más altos en células memoria y NKs. En cambio, el receptor trimérico, de alta afinidad, está compuesto por la cadena α (CD25), además de las cadenas β y γ . Estas últimas son necesarias y suficientes para la correcta señalización de la IL-2 (Nakamura *et al.*, 1994). En cambio la cadena α no participa en la señalización, pero es la responsable del aumento de la afinidad del receptor por la citocina, permitiendo la respuesta celular a los bajos niveles de IL-2 que se producen fisiológicamente *in vivo*. Niveles altos de este receptor se producen tras activación de células T y en algunas poblaciones se expresa constitutivamente, como es el caso de las células Tregs (Sakaguchi *et al.*, 1995). La IL-2 se une con alta afinidad a la molécula CD25 y esta interacción induce un cambio conformacional en la citocina que aumenta su afinidad por la subunidad CD122. Entonces el dímero IL-2/CD25 recluta la cadena CD122 seguido posteriormente de la cadena γ . En células que carecen de CD25, la IL-2 se une directamente al receptor dimérico.

La señalización intracelular se realiza a través de las colas citoplasmáticas de las cadenas β y γ del receptor que se asocian con las tirosin-quinasas JAK1 y JAK3, que son fosforiladas y en consecuencia se inician tres rutas potenciales de señalización: (JAK)-STAT, (PI3K)-AKT y MAPKs (Malek *et al.*, 2008; Taniguchi and Minami, 1993), que regularán la expresión de los genes diana correspondientes, entre ellos el propio CD25. En las células T efectoras las tres rutas de señalización

están activas, mientras que en las Tregs funciona básicamente la ruta STAT5 (**Figura 7**).

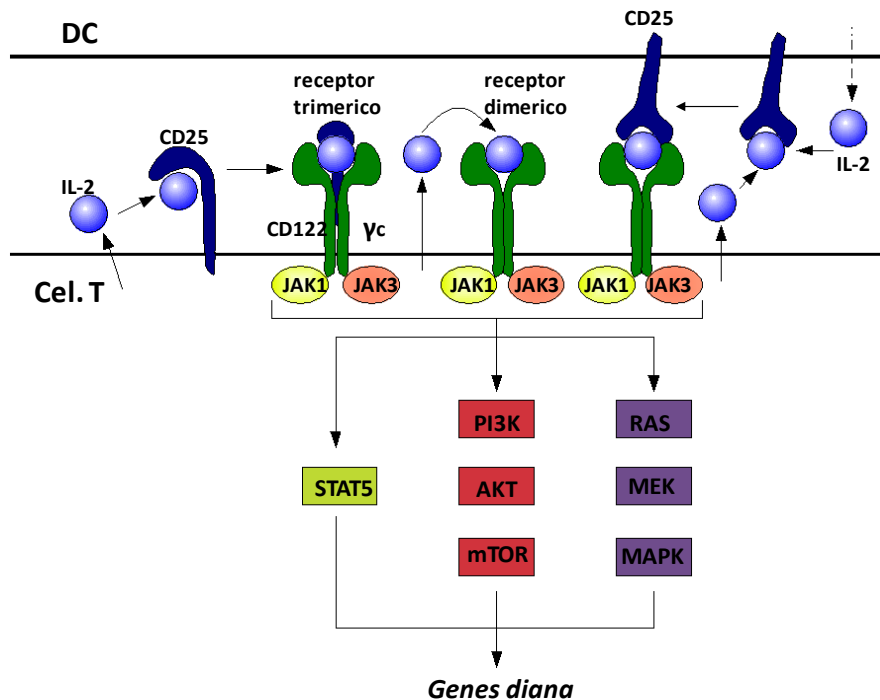


Figura 7. Sistema de señalización de la IL-2. Tras la unión de la citocina con sus receptores se activan los dominios tirosin-quinasa JAK1 y JAK3 que darán lugar a la activación de distintas rutas de señalización a través de STAT5, MAPKs o AKT.

2.2.- Regulación de la IL-2 y el IL-2Ra

La expresión de la IL-2 está controlada a varios niveles, principalmente a nivel transcripcional. Muchos de los elementos reguladores y factores de transcripción se sitúan en una pequeña región reguladora (*enhancer*) que está muy conservada tanto en humanos como en ratones. Se han identificado importantes reguladores positivos del gen de la IL-2 y existen evidencias de que todos los sitios de unión en el promotor/*enhancer* deben ser ocupados por los factores de transcripción apropiados para asegurar una transcripción óptima de la citocina (Rothenberg *et al.*, 1996). Algunos de los reguladores positivos de la transcripción de la IL-2 son NFAT y AP-1 que durante la señalización a través del TCR se activan y se unen a regiones del promotor de la IL-2. También la familia de factores NF-κB (necesarios en la coestimulación T a través del CD28) tienen 2 sitios de unión al promotor de la IL-2. Los distintos miembros de esta familia se unen a estos lugares de manera secuencial actuando como reguladores positivos (RelA, c-Rel) o negativos (NF-κB1) (Yang *et al.*, 1998). En células anérgicas en cambio, donde la transcripción de IL-2 está reprimida, estos sitios de unión son ocupados por otros factores de

transcripción como CREM, inhibiendo la expresión de la IL-2 (Kim *et al.*, 2007). La transcripción de la IL-2 también está negativamente regulada por factores como ZEB1, Aiolos o BLIMP-1 (Williams *et al.*, 1991; Martins *et al.*, 2008). El Foxp3, como sabemos un factor esencial en la diferenciación de las células Treg, también se cree que puede actuar como represor de genes como el de la IL-2, ya que tiene un sitio de unión a su promotor muy cercano al de NFAT, sugiriendo una posible competencia entre ambos factores. Se ha descrito que el reclutamiento de Foxp3 en el promotor de IL-2 ocurre a través de su interacción directa con NFAT y/o NF- κ B, inhibiendo la actividad de los mismos, esto podría explicar la función de Foxp3 como represor de este gen y la incapacidad de las células Treg para producir IL-2 (Bettelli *et al.*, 2005).

Por otro lado, la expresión del gen del IL-2R α (CD25) también está estrechamente regulada a nivel transcripcional, conociéndose al menos seis regiones reguladoras positivas (PRRI, PRRII, PRRIII, PRRIV, PRRV y PRRVI) que son necesarias tanto para la activación del IL-2R α como para la respuesta a la IL-2. Todas estas regiones que inducen la expresión del gen del IL-2R α son activadas a través de múltiples estímulos (TCR/CD28, IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 ó TNF α). De manera especial, la región PRRV, contiene elementos de unión a Smad3 y es necesario para la inducción de IL-2R α mediada por TGF β y en la que se requiere también una coestimulación a través del TCR (Kim *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2013).

El IL-2R α no se detecta en células T en reposo pero se induce tras contacto con un antígeno, situación que también induce la secreción de IL-2 que a su vez aumenta y prolonga la expresión del propio receptor, actuando así en un bucle de retroalimentación positiva (Lin *et al.*, 1997). Al igual que la IL-2, el CD25 viene regulado por miembros de la familia de NF- κ B y NFAT, pero es STAT5 (Stat5a y Stat5b en linfocitos) a través de su unión a PRRIII y PRRIV, el factor de transcripción que más rápidamente se activa en respuesta a la IL-2. De esta manera la IL-2 controla su propia respuesta celular regulando la inducción del receptor CD25 en linfocitos, hasta el punto que ratones deficientes en Stat5a/Stat5b apenas expresan CD25 tras la estimulación con IL-2 (Leonard WJ, 2001).

2.3.- La IL-2 en las células Tregs y en la plasticidad iTreg/Th17.

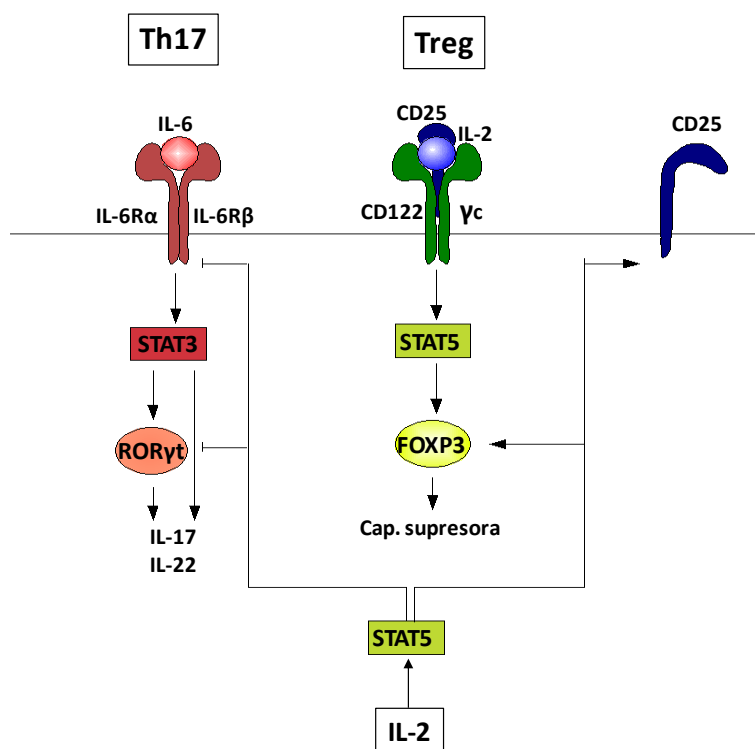
La mayor evidencia de la importancia de la IL-2 o el IL-2R α sobre la población de células Tregs viene de la demostración de que ratones deficientes en cualquiera de estos componentes acarrearán con el desarrollo de síndromes autoinmunes debidos a la ruptura de la tolerancia inmunológica y la homeostasis de linfocitos T por reducción del número de Tregs (Schorle *et al.*, 1991; Willerford *et al.*, 1995).

A nivel central, la señalización de IL-2 es esencial en la generación de nTregs en el timo. La señal del TCR al reconocer el autoantígeno resulta en una inducción de la expresión de CD25 predominantemente en las T-CD4⁺ simples positivas, que serán más sensibles a la IL-2 de manera autocrina o paracrina y que les dará la señal para inducir altos niveles de Foxp3 y aumentar aún más los niveles de CD25, generando células T reguladoras maduras y funcionales que migraran a la periferia. Esta señalización de la IL-2 en el timo, que promueve la maduración de las Treg se produce básicamente a través de la activación de STAT5 (Burchill *et al.*, 2007).

La IL-2 no solo es esencial en el timo, sino también en la periferia, para la supervivencia y homeostasis de las células iTregs (Malek *et al.*, 2010). Además, la IL-2 potencia la actividad supresora de estas células, manteniendo elevados los niveles de expresión de Foxp3 (Fontenot *et al.*, 2005). En el proceso de diferenciación a iTreg es esencial la señalización de IL-2 a través de su ruta STAT. Ya el grupo de Burchill en 2007 observó que la inactivación génica de Stat5 inhibía el desarrollo de Tregs, al tiempo que se encontraban sitios de unión de Stat5 al promotor de Foxp3 (Zorn *et al.*, 2006). También se ha comprobado que la neutralización de la IL-2 incapacita a las células para inducir Foxp3, incluso en presencia de TGF β (Davidson *et al.*, 2007). Sabemos que las células Treg no son capaces de producir esta citocina en cantidades suficientes *in vitro* o *in vivo* (Rubtsov *et al.*, 2010), por lo que dependen de la producción de IL-2 por parte de otras células. Esto es debido como vimos anteriormente a la represión ejercida por la interacción de Foxp3 bien con Runx1 o con NFAT que se unen a los sitios de unión de regulación de la producción de IL-2. Además, la unión de IL-2 a su receptor está produciendo la activación de STAT5 que a su vez refuerza la expresión de Foxp3 y se asegura este fenotipo de células T reguladoras no productoras de IL-2.

Hemos visto anteriormente como en la periferia, los linfocitos T *naive* se diferencian a iTregs y Th17 predominantemente por señales ambientales como el TGF β , el ácido retinoico y citocinas como la IL-2 o la IL-6 para expresar los genes Foxp3 o Ror γ T, adoptando las funciones propias de los subtipos reguladores y Th17 respectivamente (Chen *et al.*, 2003). El balance entre los niveles de IL-2 y las señales inflamatorias influencia la diferenciación a Th17 o Treg y también el hecho de que algunas iTregs puedan convertirse nuevamente en Th17 (Yang *et al.*, 2008). Así mismo, se conoce que el papel que ejerce la IL-2 en el balance entre las células Tregs y las Th17 *in vivo* es muy importante, ya que en ausencia de IL-2 las poblaciones de Tregs disminuyen mientras que las Th17 aumentan conduciendo a una situación de inflamación o autoinmunidad (Littman and Rudensky, 2010). En este sentido, la exposición a la IL-2 de una célula T-CD4⁺ activada conlleva un descenso en la expresión de la cadena β del receptor de la IL-6. Por lo tanto, la IL-2 reduce la activación de STAT3 que es necesaria para el desarrollo de las células Th17 ROR γ T⁺ (Liao *et al.*, 2011). Por otro lado, sabemos que la activación de STAT5 por IL-2 impide la unión de STAT3 al *locus* de IL-17 al competir por sus mismos sitios de unión (Yang *et al.*, 2011), inhibiendo de nuevo la diferenciación a la población Th17. La IL-2 también induce la expresión de Tbet, el cual inhibe la diferenciación Th17 (Liao *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta todos estos datos podemos decir que la concentración de IL-2 así como los niveles de expresión de su receptor de alta afinidad, están determinando el destino de los subtipos de linfocitos T-CD4⁺ Treg y Th17 (**Figura8**).

Figura 8. Papel de la señalización de IL-2 a través del factor STAT5 en la diferenciación y supervivencia a los subtipos celulares Th17 y Tregs. La generación de células Th17 depende de las señales aportadas por IL-6 y TGF β . Su diferenciación esta inhibida por la IL-2, ya que la activación de STAT5 limita la expresión del receptor de la IL-6. Además STAT5 compite con STAT3 por la unión al locus del gen de la IL-17. Las células Treg dependen de la IL-2 para su generación y homeostasis. El contacto con la IL-2 mantiene niveles altos de CD25 y Foxp3 en éstas células, aumentando su capacidad supresora.



3.- LA FAMILIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- β

La superfamilia de TGF β es un grupo de proteínas secretadas que ejercen acciones pleiotrópicas regulando multitud de procesos biológicos. Esta superfamilia está compuesta por más de 40 miembros e incluye, además de los TGF β s, a las **BMPs** (*Bone Morphogenetic Proteins*), las **Activinas/Inhibinas**, los **GDFs** (*Growth and differentiation factors*) y la **AMH** (*Antimüllerian Hormone*). Todas ellas se caracterizan por su forma de señalización y su estructura altamente conservada en todo el reino animal (Massague *et al.*, 1998; Moustakas *et al.*, 2002; Javelaud and Mauviel 2004; Massagué *et al.*, 2005).

En mamíferos, la familia de los TGF β está compuesta por tres isoformas altamente homólogas, **TGF β 1**, **TGF β 2**, y **TGF β 3**, codificadas por genes diferentes y que son secretadas por multitud de tipos celulares. Así, los TGF β s regulan procesos de proliferación, diferenciación, motilidad y senescencia celular. También juegan un papel muy importante en diversos procesos biológicos como la embriogénesis, la cicatrización, la respuesta inmune y la apoptosis (Letterio and Roberts, 1998; Dobaczewski *et al.*, 2011). La desregulación de sus rutas de señalización está implicada en diversas patologías y enfermedades sistémicas como el cáncer, enfermedades autoinmunes y cardiovasculares (Attisano and Wrana, 2002).

A pesar de su alta homología, estudios en animales deficientes en cada una de estas isoformas muestran que alguna de sus funciones no son redundantes (Annes *et al.*, 2003; Goumans and Mummery, 2000): **TGF β 1** está involucrado en hematopoyesis, en la diferenciación endotelial y en procesos de inflamación y autoinmunidad (Dickson *et al.*, 1995 Kulkarni *et al.*, 1993; Letterio *et al.*, 1996; Shull *et al.*, 1992). **TGF β 2** afecta al desarrollo del corazón, pulmón, extremidades, ojos, oídos y sistema urogenital (Sanford *et al.*, 1997). En cambio, **TGF β 3** influye en la palatogénesis y el desarrollo pulmonar (Kaartinen *et al.*, 1995; Proetzel *et al.*, 1995). La isoforma que ha servido como modelo preferente para estudiar los mecanismos de activación de receptores por ligando y las vías de señalización es TGF β 1. Mutaciones en ratones para TGF β 1 provocan respuestas inflamatorias multiorgánicas severas, además de tener una letalidad embrionaria del 50%. Mutaciones en las otras dos isoformas resultan en un 100% de letalidad embrionaria (Dickson *et al.*, 1995, Sanford *et al.*, 1997, Kaartinen *et al.*, 1995).

3.1.- Síntesis de TGFβs

Las tres isoformas de TGFβs se sintetizan inicialmente como precursores homodiméricos grandes. Todos ellos son procesados en el interior de aparato de Golgi por proteasas tipo furina (Munger *et al.*, 1997), las cuales rompen el precursor dando lugar a un fragmento N-terminal de la proteína donde están los TGFβs maduros o activos y a un extremo C-terminal que se conoce como LAP (*latency-associated peptide*). Los dímeros maduros de TGFβ permanecen asociados a sus LAPs después de la secreción al medio extracelular (Roberts and Sporn, 1990), mediante enlaces no covalentes, formando el complejo SLC (*Small Latent Complex of TGFβ*). Los TGFβs no pueden interactuar con sus receptores debido a estos prodominios LAP de los TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3, siendo los responsables de la latencia o ausencia de efecto biológico de estos factores de crecimiento (Annes *et al.*, 2003). Los TGFβs secretados forman posteriormente complejos moleculares denominados LLC (*Large Latent Complex of TGFβ*) que se unen covalentemente a la matriz extracelular (ECM). En la formación del LLC, se establecen puentes disulfuro entre residuos cisteína del LAP y cisteínas de glicoproteínas denominadas LTBPs (*latent-TGFβ-binding proteins*) (Gleizes *et al.*, 1996; Miyazono *et al.*, 1991; Saharinen *et al.*, 1996). Las LTBPs son miembros de la familia de proteínas LTBP/fibrillin, la cual comprende por un lado a Fibrillin-1, Fibrillin-2 y Fibrillin-3, y por otro a LTBP-1, LTBP-2, LTBP-3 y LTBP-4 (Ramirez and Pereira, 1999). LTBPs, y el TGFβ latente unido a ellos, aparecen como componentes de la ECM. De hecho, la región N-terminal del LTBP se une covalentemente a proteínas de la ECM por la acción de la enzima *transglutaminasa* (Nunes *et al.*, 1997). Se ha propuesto que los LTBPs tienen una función dual, como componentes estructurales de la ECM y como moduladores de la disponibilidad de TGFβ. Aunque los LTBPs podrían tener actividades no relacionadas con TGFβ, todas las referencias encontradas al respecto en la literatura los señalan como moduladores de la actividad de los TGFβs, facilitando su secreción, almacenamiento o activación (Drews *et al.*, 2008; Todorovic *et al.*, 2005).

3.2.- Activación de los TGFβs latentes

La actividad extracelular de los TGFβs está regulada principalmente mediante la conversión del TGFβ latente en TGFβ activo. La liberación del TGFβ maduro del complejo latente se lleva a cabo por diversos mecanismos que suelen conllevar una escisión proteolítica del LAP. El procesamiento proteolítico del LAP produciría una desestabilización de las uniones entre dicha molécula y el TGFβ y podría liberar las

formas activas de TGF β de sus complejos de latencia (Lyons *et al.*, 1988). Una vez liberado de la ECM, el dímero de TGF β puede ser capaz de unirse a sus receptores celulares.

Un gran número de proteasas, entre las que se incluyen la Plasmina, la Catepsina D, la MMP-2 (*Matrix metalloproteinase 2*) y la MMP-9, han sido identificadas en estudios *in vitro* como activadores de los TGF β latentes (Annes *et al.*, 2003). También existen evidencias genéticas *in vivo* que señalan como activadores del TGF β latente a la Trombospondina-1 (TSP-1), a través de su interacción con LAP, produciendo un cambio conformacional que permitiría su unión al receptor (Crawford *et al.*, 1998; Schultz-Cherry *et al.* 1995). Otros mediadores de la activación son las integrinas $\alpha\text{v}\beta_6$ y $\alpha\text{v}\beta_8$, que actúan como transductores mecánicos transmitiendo información de la ECM al interior de la célula, al margen de otras funciones en la adhesión celular, la forma, la migración, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celulares (Hynes, 2004; Koli *et al.*, 2001; Munger *et al.*, 1999). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son capaces también de oxidar proteínas LAP, las cuales pierden así su asociación no covalente al TGF β , permitiendo su activación (Barcellos-Hoff *et al.*, 1996). Sin embargo, los ratones con mutaciones que anulan individualmente a los genes que codifican a conocidas proteasas activadoras de TGF β no han mostrado un fenotipo coherente con la deficiencia en la actividad TGF β . Esto puede reflejar la redundancia funcional entre las enzimas de activación (Annes *et al.*, 2003).

3.3.- Unión a los receptores de TGF β s

En base a sus características estructurales y funcionales, los receptores se dividen en dos subfamilias (Schmierer and Hill, 2007): Receptores tipo I denominados T β RI o ALK (*Activin-Receptor Like Kinases*) y Receptores tipo II denominados T β RII (Manning *et al.*, 2002). En mamíferos se han descrito 5 receptores tipo II y 7 de tipo I (ALK1-7) para TGF β s, Activinas, BMPs, Nodal y AMH.

Los dímeros de TGF β s se unen a los receptores de tipo I y tipo II formando un complejo heterotetramérico en la superficie celular, compuesto por el TGF β dímérico, dos receptores tipo II y dos receptores tipo I. Tras la interacción con el ligando, el T β RII, que posee una actividad kinasa en serinas/treoninas, fosforila al T β RI en una región conservada rica en glicina y serina denominada dominio GS. Esta fosforilación provoca un cambio conformacional en el T β RI promoviendo una actividad kinasa en serinas/treoninas responsable de la propagación de la señal.

Esta fosforilación es suficiente para que se activen las diferentes vías de señalización (Wharton and Derynck, 2009). A pesar de disponer ambos de un dominio de unión a TGF β , la afinidad de T β RII por el ligando es mucho mayor que la de T β RI y éste último sólo puede unirse a TGF β cuando ha sido previamente captado por T β RII. Por lo tanto, en la formación del complejo heterotetramérico de receptores, T β RI debe ser reclutado por un complejo T β RII:TGF β preformado (Laiho *et al.*, 1991). Existe además otro receptor de tipo III (T β RIII), llamado betaglicano, capaz de interaccionar con las 3 isoformas de TGF β , aunque muestra particular afinidad por TGF β 2. Está involucrado en la formación del complejo de receptores y funciona predominantemente presentando el ligando al T β RII (Massagué, J. 1998). Los receptores T β RI y T β RII son expresados ubicuamente en las células de los mamíferos. En estado basal, es decir en ausencia de ligando, la proteína FKBP12 está unida al dominio GS del T β RI, adoptando una conformación que impide la fosforilación por T β RII, lo cual previene la señalización independiente del ligando (Chen *et al.*, 1997; Datta *et al.*, 1998; Huse *et al.*, 1999).

La unión del TGF β a su receptor conlleva la internalización del complejo por medio de las balsas lipídicas (*lipid rafts*) caveolin-positivas y las vías endocíticas de clatrina. La ruta de la clatrina se considera esencial para la activación de la cascada de señalización del TGF β , mientras que la internalización del receptor en los *lipid raft* induce su degradación, inhibiendo la señalización por TGF β (Di Guglielmo *et al.*, 2003).

3.4.- Ruta canónica: Señalización por Smad2/3

La señalización de TGF β mediada por proteínas Smad representa una cascada de señalización muy conservada. En vertebrados se han descrito 9 proteínas Smad diferentes (Raftery *et al.*, 1995; Savage *et al.*, 1996; Heldin *et al.*, 1997) que se clasifican en 3 familias en base a su función celular:

- R-Smads** (*receptor-activated Smads*): Smad1, 2, 3, 5 y 8. Estos Smads son sustratos de fosforilación de los receptores tipo I: Smad2/3 son fosforilados por receptores de TGF β s y Activinas, y Smad1/5/8 por receptores de BMPs (Macias-Silva *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997)
- Co-Smads** (*co-mediator Smads*): Smad4 y 10, que oligomerizan con R-Smads activados para formar complejos que se translocarán al núcleo para modular

la transcripción de genes diana (Derynck *et al.*, 1998; Massague, 1998; Heger *et al.*, 2009).

-I-Smads (*inhibitory-Smads*): Smad6 y 7, que inhiben la señalización de TGF β o BMP por competición con R-Smads por la interacción con el receptor tipo I y mediante la captación de fosfatasas y ubiquitin-ligasas (Itoh and Ten Dijke, 2007; van Meeteren and Ten Dijke, 2011). También compiten con Smad4 (Shi and Massagué, 2003). Smad7 inhibe preferentemente la vía de TGF β s, mientras que Smad6 actúa sobre la vía de BMPs (Derynck and Akhurst, 2007; Santibanez *et al.*, 2011).

El T β RI activado e internalizado fosforila a los efectores intracelulares de la familia Smad (Massague *et al.*, 2005). La fosforilación de T β RI transforma la región GS, de un sitio de unión de FKBP12 en estado basal, a un sitio de unión de Smad2/3, que son a continuación fosforilados por el T β RI y liberados para propagar la señal (Huse *et al.*, 2001). R-Smads y Smad4 están predominantemente localizados en el citoplasma pero se translocan al núcleo tras su dimerización. Allí, en colaboración con otros factores nucleares, se unen al DNA y regulan la expresión de genes específicos (Massague and Wotton, 2000). Su actividad está modulada por proteínas adaptadoras como SARA (*Smad anchor for receptor activation*) que los mantiene secuestrados en el citoplasma pero que tras activación facilitan la interacción de los Smad2/3 con el receptor de TGF β activado (Tsukazaki *et al.*, 1998). Esta interacción también parece ocurrir en la membrana plasmática antes de la internalización de receptor (Di Guglielmo *et al.*, 2003). Otras proteínas han sido propuestas para participar en la interacción de los Smad2/3 con el complejo de receptores. Por ejemplo, las proteínas TRAP-1 (*TGF β -receptor-associated protein*) (Wurthner *et al.*, 2001) y TLP (*TRAP-1-like protein*) (Felici *et al.*, 2003) han sido descritas como proteínas adaptadoras que también interaccionan con el complejo de receptores y que facilitan la formación de complejos Smad2/3 con Smad4.

La translocación al núcleo de los complejos R-Smads/Smad4 es regulada por diferentes mecanismos que incluyen interacciones con Importinas, Exportinas y Nucleoporinas (Xu *et al.*, 2007). Una vez en el núcleo los Smads se acumulan e interaccionan con sus sitios de unión SBE (*Smad binding elements*) al DNA con baja afinidad. Esta unión será potenciada en presencia de coactivadores transcripcionales. La respuesta génica al TGF β en cada tipo celular va a depender de la presencia o ausencia de estos cofactores, de la combinación de los mismos con

R-Smad-Smad4 y por último si estos cofactores se van a tratar de co-activadores o co-represores transcripcionales del gen diana (Massague *et al.*, 2005; Ross and Hill, 2008) **Figura 9.**

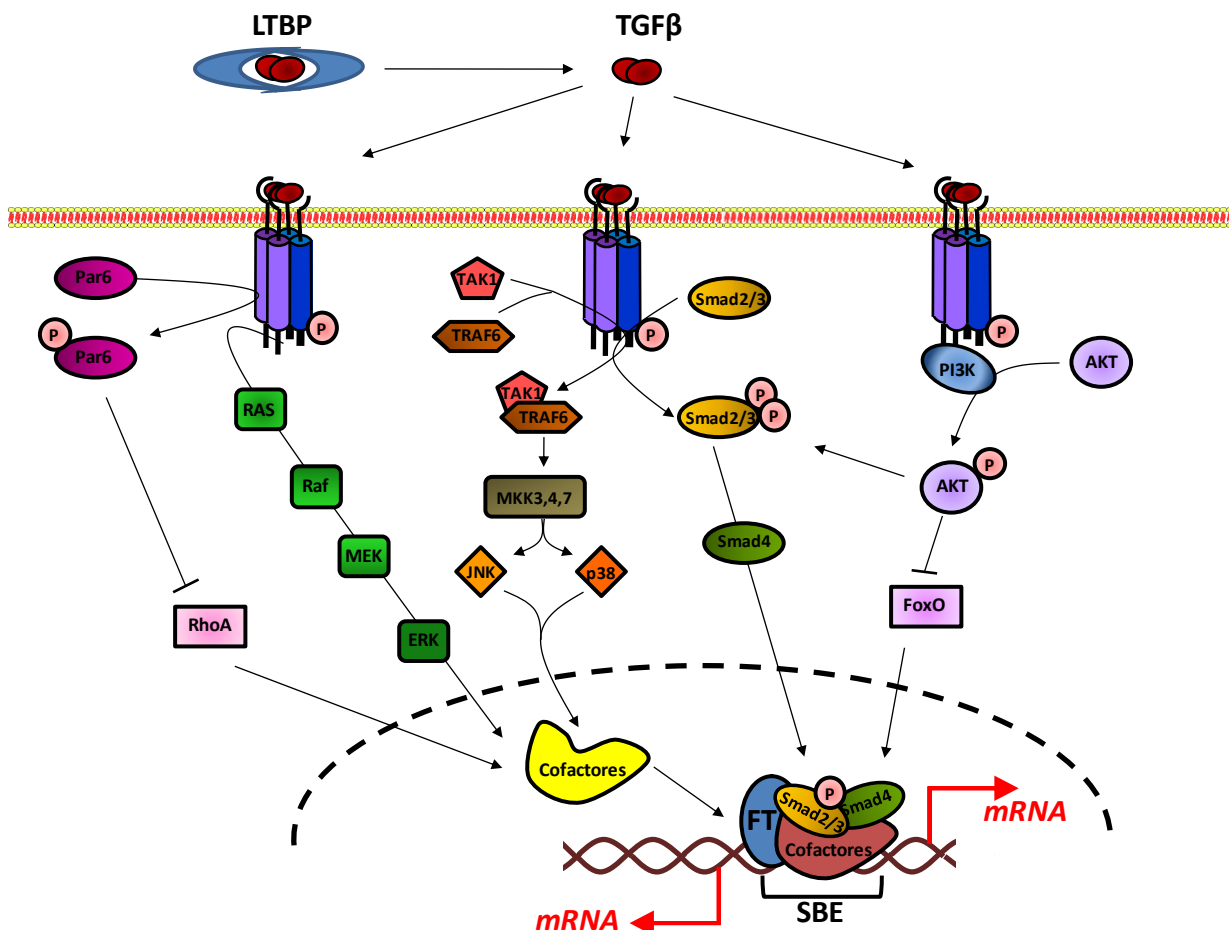


Figura 9. Diagrama esquemático de la señalización de TGFβ desde la membrana al núcleo. La unión de TGFβ activo después de liberarse del complejo LTBP, conlleva la formación del complejo heteromérico de los receptores TβRI y II, donde el TβRII fosforila al TβRI. La señalización está mediada por los dominios quinasa de estos receptores, activando rutas canónicas SMAD y rutas no SMAD. En la ruta canónica, los R-Smad (2y3) son fosforilados por el receptor I y se asocian al SMAD4 para acumularse posteriormente en el núcleo, donde se unirán a los *Smad binding elements* (SBE) de los genes diana junto con una serie de co-factores y factores de transcripción (FT). La activación de las rutas no-Smad a partir del complejo receptorial incluyen: la fosforilación de Par6 que inhibe a RhoA en las *tight junctions* influyendo en la polarización y la EMT; la activación de MAPKs y PI3K donde intervienen también TAK1 y TRAF6 importantes en la inducción de apoptosis y diferenciación; y la ruta de PI3K/Akt importante en la migración celular y antagonizando muchas veces con la ruta de los Smads.

3.5.- Rutas no canónicas: Rutas No-Smad

En la señalización por TGF β s existen varias rutas de señalización intracelular diferentes a la ruta canónica vía Smads (Moustakas and Heldin, 2005). Estas rutas no canónicas son activadas normalmente mediante fosforilación o interacción directa de los T β RII con sus sustratos y pueden servir para atenuar o reforzar las respuestas celulares producidas por la vía canónica. Entre estas vías no-Smad las más estudiadas son: **(a)** la ruta de las MAP kinasas (MAPKs), que se dividen en ERK 1/2, JNK y p38 (Roux and Blenis, 2004); **(b)** La de las GTPasas tipo Rho (Rho-like GTPase); y **(c)** la vía de fosfatidilinositol-3-quinasa/Akt (PI3K/Akt) (Engel *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002; Derynck and Zhang, 2003; Zhang, 2009; Dobaczewski *et al.*, 2011) **Figura 9.**

3.5.1.- Señalización a través de ERK

En los últimos años se ha demostrado que algunos receptores de TGF β , característicamente los T β RII, además de una actividad serina-treonina-quinasa, también tienen actividad tirosina-quinasa, capaz de promover la activación de la vía MAPK (Mu *et al.*, 2011). En esta ruta de señalización RTK (*receptor tyrosine kinase*)/Ras/Erk, la unión de los factores de crecimiento a sus RTKs induce la dimerización y activación de estos receptores (McKay and Morrison, 2007). Lo que resulta en una fosforilación de múltiples residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de estos receptores RTK. Una vez fosforilados, sirven como lugares de unión para numerosas moléculas señalizadoras en la membrana plasmática donde activan a Ras que se une a Raf e inicia una cascada de señalización por MAPKs que incluye a MEK y Erk.

Erk regula la transcripción de sus genes diana a través de factores de transcripción en conjunción con los Smads. La activación de Erk es una de las rutas de señalización celular no-Smad necesarias para la transición epitelio-mesénquima (EMT) mediada por los TGF β s (Davies *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que Erk puede fosforilar R-Smads, incluyendo a Smad1, Smad2 y Smad3, para regular sus actividades (Kretzschmar *et al.*, 1999).

3.5.2.- Señalización a través de JNK/p38

Como Erk, JNK y p38 están activadas por las MKKs (*MAP kinase kinases*), específicamente por MKK4 y MKK3/6, respectivamente (Weston and Davis, 2007) y

anteriormente, las MKKs son activadas por las MAP3Ks (*MAP kinase kinase kinases*); en el caso de MKK4 y MKK3/6, la TAK1 (*TGF β -activated kinase 1*) es una de las MAP3Ks activadoras (Yamaguchi *et al.*, 1995). La proteína TRAF6 juega un importante papel en la activación de TAK1 en rutas de señalización mediadas por receptores de interleucinas proinflamatorias y receptores tipo Toll (Moustakas and Heldin 2003). La unión de TRAF6 al complejo de receptores activados por TGF β induce la asociación ulterior de TAK1, así como su poliubiquitinización y activación (Sorrentino *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2008).

Aparte de TAK1, otras dos MAP3Ks, MEKK1 y MLK3, han sido propuestas como mediadores de la activación inducida por TGF β de las rutas JNK o p38 vía MKK4 o MKK3/6 respectivamente (Zhang, 2009). Aunque TGF β induce la activación de las rutas JNK/p38 independientemente de la activación de los Smads, la cascada señalizadora TRAF6-TAK1-JNK/p38 funciona en conjunción con la ruta canónica de los Smads para regular diversas respuestas celulares, como la apoptosis o la EMT (Birkey-Reffey *et al.*, 2001; Yanagisawa *et al.*, 2001; Edlund *et al.*, 2003).

3.5.3.- Señalización a través de Rho-like GTPasas

Las Rho-like GTPasas, incluyendo a las RhoA, Rac y Cdc42, juegan papeles importantes controlando la organización dinámica del citoesqueleto y la motilidad celular (Jaffe and Hall, 2005). La activación de RhoA inducida por TGF β s parece ser independiente de Smad2 y/o Smad3, como sugiere la incapacidad de los mutantes dominantes negativos de *Smad3* de bloquear la actividad de RhoA en células epiteliales (Bhowmick *et al.*, 2001). Par6, una proteína andamio o adaptadora implicada en la regulación de la polaridad en células epiteliales (Gao *et al.*, 2002), interacciona con el T β RI en las uniones estrechas celulares. La estimulación por TGF β s induce la formación y activación de complejos T β RII-T β RI donde T β RII fosforila a Par6. Tras la fosforilación, Par6 recluta a Smurf1 en los complejos de receptores. El complejo Par6-Smurf1, a continuación, media la ubiquitinación localizada y eliminación de RhoA en las protrusiones celulares, lo que permite la disolución dependiente de TGF β de las uniones estrechas, un requisito previo para la EMT (Ozdamar *et al.*, 2005).

Además de RhoA, los TGF β s también pueden inducir la activación de la GTPasa Cdc42. La activación de Cdc42 por TGF β parece ser independiente de Smads, porque bloqueando la fosforilación de Smad2 y Smad3, simultáneamente o por

separado, no se ve afectada la actividad de PAK (*p21-activated kinase*), un efector de Cdc42 (Wilkes *et al.*, 2003).

3.5.4.- Señalización a través de PI3K/AKT

Los TGF β s pueden activar PI3K y AKT, presumiblemente mediante la interacción física de la subunidad p85 de PI3K con el complejo heterotetramérico de receptores (Yi *et al.*, 2005). Esta activación parece ser independiente de la ruta canónica de los Smad2/3 (Wilkes *et al.*, 2005). PI3K está implicado en la reorganización de los filamentos de Actina mediada por TGF β y en la migración celular. Sin embargo, en muchas otras respuestas celulares inducidas por TGF β s, la ruta de señalización PI3K/AKT antagoniza con los efectos mediados por la vía Smad. Por ejemplo, la activación de PI3K o AKT protege a las células de la apoptosis o de la inhibición del crecimiento inducido por los TGF β s (Chen *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2006). Se ha sugerido que esta protección sería el resultado de una interacción física entre AKT y Smad3. Esta interacción impediría a Smad3 unirse al T β RI para ser fosforilado, por lo que se inhibe su transporte al núcleo y la transcripción mediada por este factor (Conery *et al.*, 2004; Remy *et al.*, 2004).

Además de AKT, el factor de transcripción FoxO también juega un papel importante en el efecto antagónico de PI3K/AKT sobre la transcripción mediada por Smad2/3. Es bien conocido que los TGF β s son unos potentes inhibidores de la proliferación celular. Un elemento clave en esta función es su capacidad de suprimir la transcripción del protooncogen *c-Myc*, e inducir la expresión de *p15^{Ink4b}* y/o *p21^{Cip1}*, los cuales son inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas de la fase G1 (“*cyclin-dependent kinases*”, Cdk) (Massague, 2008a). En el caso de la inducción de la expresión de *p15^{Ink4b}* y *p21^{Cip1}*, es necesario un complejo formado por Smad3, Smad4 y FoxO. Las proteínas FoxO son objetivos de la vía PI3K/AKT y AKT puede inhibir la localización nuclear de las proteínas FoxO fosforilándolas. De esta forma impide que actúen sobre sus genes diana (Gomis *et al.*, 2006; Seoane *et al.*, 2004).

3.6.- Regulación de la vía de señalización de TGF β

Todos los elementos de la vía de señalización de TGF β son susceptibles de ser regulados. La respuesta celular al TGF β está determinada por la composición extra e intracelular de los componentes de este sistema de transducción de señales. Muchos factores controlan el acceso, la abundancia y bioactividad de los diferentes ligandos y receptores, lo que determinará la naturaleza y la intensidad de la señal

en el núcleo, además de otras señales que darán forma a la respuesta regulando las rutas Smad o las rutas alternativas (Kang *et al.*, 2009). Los TGFβs y sus receptores están expresados ubicuamente en multitud de tipos celulares por lo que su regulación debe ser compleja, multifactorial y específica del contexto y del tipo celular para mantener así las funciones fisiológicas normales y su intervención en la patogénesis de numerosas enfermedades (Moustakas and Heldin, 2009; Umulis *et al.*, 2009). En el espacio extracelular, la señalización mediada por miembros de la superfamilia TGFβ está regulada por la abundancia y el tipo de ligandos TGFβ 1, 2 y 3 y por la presencia de moléculas que limitan su disponibilidad (Shi and Massague, 2003). Estas moléculas reguladoras incluyen un numeroso conjunto de proteínas difusibles extracelulares (Umulis *et al.*, 2009), como son:

- Foliatina, una proteína que suprime la hormona estimuladora del folículo (FSH) al unirse a la Activina e impedir su unión a los receptores de Activina (Winter *et al.*, 1996). También puede unirse a los BMPs con efectos similares (Iemura *et al.*, 1998)
- Nogina y Cordinan antagonizan específicamente con la señalización de BMPs pero no de Activinas o TGFβs (Zimmerman *et al.*, 1996)
- Familia de proteínas solubles DAN, que incluye miembros como Dante, Drm/Gremlin, Cerberus o Caronte, antagonizan con ligandos específicos de la familia de BMPs y TGFβs (Stanley *et al.*, 1998; Agius *et al.*, 1996). Alguno de estos miembros están implicados en la regulación de otras vías de señalización como la de Wnt/β-catenina y Nodal.

A nivel de la membrana, existen receptores accesorios que aumentan la afinidad de TGFβs y BMPs a los receptores tipo I y II, pero que carecen de los dominios de señalización quinasa. Por ejemplo, el betaglicano o receptor de TGFβ tipo III, que aumenta especialmente la respuesta a TGFβ2, o la Endoglin, muy expresada en células endoteliales, que parece inhibir la respuesta a TGFβ por ser el receptor accesorio para el ligando de ALK1 (Wharton and Derynck, 2009; Attisano, 1993; Letamendia, 1998).

Otro punto de regulación se sitúa a nivel de los factores que cooperan con las proteínas Smad para regular la transcripción de distintos genes diana. Estos complejos Smad regulan la transcripción reclutando “lectores”, “modificadores” y

“remodeladores” de la cromatina. La disponibilidad de estos *partners* determinará qué genes serán activados o cuales suprimidos.

SARA (*Smad anchor for receptor activation*) por su parte facilita la interacción de los R-Smads con los receptores de TGF β activados. Una vez fosforilados, los Smad2/3 se liberan de SARA permitiendo su desplazamiento al núcleo (Tsukazaki, 1998).

Un nivel adicional de control de esta vía de señalización es a través de la modulación del proceso de internalización, reciclado y degradación de sus receptores. Los complejos TGF- β /receptor se internalizan por endocitosis. Para que se produzca la activación de R-Smads se requiere la internalización mediada por vesículas de clatrina, mientras que la internalización del complejo por balsas lipídicas (caveolina positivas) se asocia con la degradación del receptor. La selección de la ruta de internalización de los receptores definirá por tanto la intensidad y duración de las señales y el reciclado o degradación de los receptores (Kang *et al.*, 2009). SMURF1 (*Smad ubiquitination regulatory factor-1*) es una E3 ubiquitin-ligasa que poliubiquitina a los R-Smad para que éstos y el receptor sean degradados en el proteasoma vía internalización a través de vesículas caveolina positivas (Di Guglielmo, 2003). El recambio de los receptores de TGF β en la superficie celular es un punto importante de regulación y TACE es una metaloproteasa transmembrana llamada también ADAM17 que elimina proteolíticamente el ectodominio de T β RI pero no del T β RII. Este proceso es facilitado por la ubiquitinación de T β RI a través de TRAF6. Dicho recambio es activado en respuesta a la señalización por ERK o p38.

Las Smad inhibidoras (I-Smads 6 y 7) regulan de forma negativa la intensidad y la duración de la señal mediada por TGF β (Itoh and ten Dijke, 2007). Las I-Smads se unen a los receptores de tipo I inhibiendo de forma competitiva la fosforilación de las R-Smad. Además, promueven el reclutamiento de fosfatasas y ubiquitin ligasas como Smurf1 regulando a la baja los niveles y la actividad de los receptores (Moustakas and Heldin, 2009).

Por último el estado epigenético de la célula incluyendo la metilación del DNA, las modificaciones de histonas, RNA no codificante (miRNA) o la conformación de la cromatina, dictarán los genes que son susceptibles de ser expresados y por tanto susceptibles de regulación. Los miRNAs inhiben o promueven la degradación de

ciertos mRNA diana como T β RII y se les considera reguladores dinámicos de las distintas rutas de señalización (Bartel *et al.*, 2004; Inui M *et al.*, 2010) **Figura 10.**

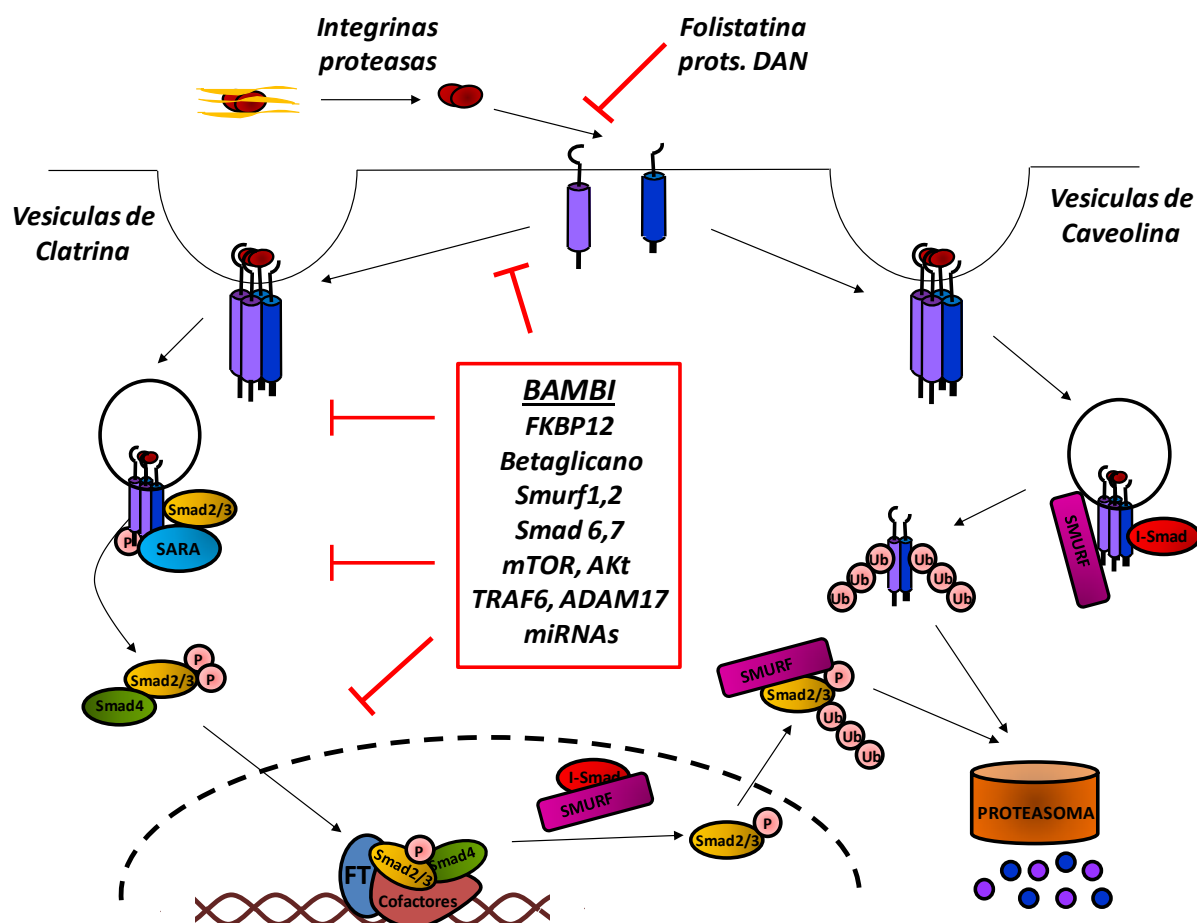


Figura 10. Regulación de la señalización por TGFβ. En el medio extracelular la disponibilidad del ligando TGFβ esta sujeta a diversas integrinas y proteasas que lo liberen de la matriz extracelular, así como de distintas proteínas que interfieren con la unión a sus receptores como la folistatina o diversos miembros de la familia DAN. La internalización del receptor tras unión al TGFβ puede ocurrir por 2 vías: en vesículas de clatrina o de caveolina. En estas últimas la presencia de la proteína SARA permite la activación de los Smads y el inicio de la ruta canónica de señalización, mientras que si la internalización ocurre en vesículas de caveolina, se produce un reclutamiento de I-Smads y Smurf que median la poli-ubiquitinación y degradación en el proteasoma. La ruta canónica de señalización de TGFβ esta regula a multiples niveles (en el recuadro rojo se muestran algunos ejemplos de inhibidores de la ruta), desde la formación de los complejos receptoriales, la activación de R-Smads y su transporte al núcleo hasta la formación de los complejos transcripcionales de unión al DNA.

3.7.- BAMBI (BMPs and Activin Membrane Bound Inhibitor)

Entre los mecanismos que regulan la señalización mediada por TGF β s destaca la proteína BAMBI (BMP and activin receptor membrane-bound inhibitor) identificada inicialmente como un inhibidor de la señalización por BMPs. (Onichtchouk *et al.*, 1999). El gen *bambi* (*nma* en humanos) codifica para una glicoproteína transmembrana de 260 aminoácidos muy conservada en vertebrados a lo largo de la evolución. Esta proteína tiene un dominio extracelular similar al de los receptores tipo I de TGF β con los cuales heterodimeriza. Sin embargo, el dominio intracelular de BAMBI carece de actividad enzimática serina-treonina quinasa lo que convierte a BAMBI en un pseudo-receptor incapaz de transmitir la señal al interior de la célula. Por ello, se comporta como un inhibidor de la señal de TGF β s/BMPs/activinas compitiendo con los receptores de tipo I por la incorporación del ligando, provocando un descenso en la formación de complejos receptor/ligando activos (Onichtchouk *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2007). Además de interferir con la formación de dichos complejos I, BAMBI es capaz de cooperar con Smad7, formando complejos ternarios con el T β RI e inhibiendo su interacción con Smad3 y por tanto impidiendo su activación y perjudicando la señalización por TGF β (Xiaohua *et al.*, 2009). Así mismo BAMBI es capaz de co-translocarse al núcleo con Smad2/3 tras tratamiento con TGF β en cáncer ovárico (Pils *et al.*, 2010), aunque las consecuencias funcionales de este fenómeno no son conocidas todavía.

Además de su papel inhibidor en la señalización por TGF β , BAMBI está estrechamente coexpresado junto a BMP4 durante el desarrollo de varias especies, y la inducción y estabilidad de su expresión requiere una señal mantenida de BMPs, por lo que se cree que actúa en un bucle de retroalimentación negativa regulando la señal de BMPs (Onichtchouk *et al.*, 1999; Grotewold *et al.*, 2001).

Estudios recientes muestran que BAMBI también puede estar implicado en la regulación de la ruta de señalización de Wnt/ β -catenina, la cual es muy importante en embriogénesis, proliferación celular y desarrollo tímico. Se ha demostrado que BAMBI se une al receptor de la señalización Wnt, Frizzled5, induciendo una progresión del ciclo celular dependiente de esta ruta (Lin *et al.*, 2008). Que BAMBI pueda estar implicado en proliferación celular se ha observado en varias ocasiones, por ejemplo se ha encontrado que BAMBI está directamente inducido en células tumorales de cáncer colorectal, promoviendo la actividad transcripcional de esta señalización por Wnt/ β -catenina (Sekiya *et al.*, 2004; Lin *et*

al., 2008). En base a estas observaciones se ha propuesto que la inducción de BAMBI en estas células las permite escapar de la parada en el ciclo celular inducida por TGF β , permitiendo de este modo aumentar la motilidad y capacidad de invasión de las células tumorales (Togo *et al.*, 2008).

Entre los reguladores de la expresión de BAMBI descritos hasta el momento se encuentran BMP4, TGF β , β -catenina y ácido retinoico que inducen su expresión. Por otro lado, se ha encontrado que el LPS, activando a TLR4, disminuye la expresión de BAMBI en hepatocitos, haciéndolos más sensibles al TGF β y promoviendo sus efectos fibróticos (Onichtchouck *et al.*, 1999; Sekiya and Oda, 2004; Sekiya and Adachi, 2004; Seki E, 2007; Higashihori, 2008). Por lo tanto, BAMBI parece interaccionar con varias rutas celulares, como antagonista de la señalización de TGF β , como inductor de la señalización de Wnt/ β catenina y en la inmunidad innata mediada por TLR4.

En ratones, la eliminación de BAMBI no produce alteraciones significativas en el desarrollo embrionario y postnatal. Su ausencia en ratones deficientes para esta proteína no provoca fenotipos morfológicos o de conducta aparentes. Como consecuencia de esto la función fisiológica de BAMBI permanece en gran parte desconocida (Chen *et al.*, 2007; Tramullas *et al.*, 2010). Sin embargo, cada vez son más los estudios que relacionan las alteraciones en la acción reguladora de esta molécula sobre la señalización de TGF β con varios procesos patológicos y cancerígenos, donde su expresión se correlaciona con crecimiento tumoral y metástasis (Sekiya *et al.*, 2004; Togo *et al.*, 2008; Fritzmann *et al.*, 2009; Khin *et al.*, 2009). Un estudio reciente muestra una disminución en la expresión de BAMBI en la fibrosis hepática inducida por activación de TLR4 mediante LPS, favoreciendo el efecto fibrogénico de TGF β (Seki *et al.*, 2007). También se ha encontrado una reducción de la expresión de BAMBI en otros modelos de inflamación hepática donde su sobreexpresión perjudicaba la fosforilación de Smad2 inducida por TGF β produciendo un efecto antifibrótico (Wanninger *et al.*, 2011). Además, en los ratones BAMBI^{-/-} presentan una menor sensibilidad al dolor y desarrollan una fibrosis cardíaca acelerada tras sobrecarga ventricular (Tramullas *et al.*, 2010; Villar *et al.*, 2012), lo que sugiere su posible implicación en la regulación de fenómenos inflamatorios. Recientemente se ha demostrado que BAMBI se expresa en células endoteliales donde participa en la homeostasis vascular a través de la vía alternativa de TGF β (Guillote *et al.*, 2012; Sandhya *et al.*, 2010). Por último, se ha encontrado expresión de BAMBI en pulmón humano, donde sus niveles se incrementan en

respuesta a la infección por *Haemophilus influenzae*, motivo por el cual se le ha implicado en la patogenia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Drömann, 2010).

3.8.- Papel relevante de TGF β en el sistema inmune

En términos generales se puede considerar al TGF β 1, el principal miembro de la familia TGF β con funciones en el sistema inmune, como una citocina supresora de la respuesta inmune. En este sentido, su deficiencia en ratones provoca la aparición de un síndrome inflamatorio sistémico muy severo acompañado de una aceleración de la mortalidad de estos (Shull *et al.*, 1992). El efecto más destacado de TGF β en la respuesta inmune es su capacidad para inhibir la proliferación linfocitaria. Este efecto se atribuye, entre otros posibles mecanismos a su capacidad para inhibir la producción de IL-2 (Brabletz *et al.*, 1993). También inhibe la proliferación de otros tipos celulares por mecanismos diversos como el aumento de los inhibidores del ciclo celular p15, p21 o p27 (Hannon *et al.*, 1994; Datto *et al.*, 1995; Polyak *et al.*, 1994), así como la disminución en la expresión de c-myc, crucial para la proliferación celular (Coffey *et al.*, 1988). De la misma manera, nuestro grupo demostró la existencia de un efecto anti-proliferativo de TGF β en linfocitos T-*naïve* por un mecanismo dependiente de p27 (Iglesias *et al.*, 2013).

Durante el desarrollo linfocitario T en el timo, la señalización por TGF β juega papeles diferentes sobretodo en el desarrollo y supervivencia de células nTreg y la maduración de timocitos simple positivos (SP), actuando diferencialmente en función de la edad, siendo más importante durante la primera semana de vida (Li *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008), aunque los mecanismos moleculares aun no se conocen con exactitud. En la periferia, TGF β actúa inhibiendo la mayor parte de las funciones efectoras de las distintas poblaciones de linfocitos T. En presencia de TGF β las células T-CD8⁺ no adquieren su capacidad citotóxica y los linfocitos T-CD4⁺ no se diferencian a Th1 o Th2, ya que TGF β inhibe la expresión de IL-12R y Gata3 respectivamente (Gorelik *et al.*, 2000; Gorham *et al.*, 1998). No obstante, tras un estímulo a través del TCR, la presencia de TGF β promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ a distintas subpoblaciones funcionales, en función de las condiciones del entorno.

TGF β también inhibe la activación de macrófagos y su producción de mediadores inflamatorios (Bogdan *et al.*, 1993), y previene la maduración de células dendríticas, actuando sobre la expresión del MHCII (Yamaguchi *et al.*, 1997). En los linfocitos B, el TGF β inhibe su proliferación, induce la apoptosis en los linfocitos B inmaduros y bloquea su activación. Además en la producción de anticuerpos, induce el cambio de subclase a IgA. Por lo tanto TGF β tiene a su vez efectos inhibitorios y estimuladores sobre las células B. (Stavnezer *et al.*, 1995; Lebman and Edmiston, 1999). Esta citocina también controla la homeostasis de NKs y suprime su actividad citotóxica (Laouar *et al.*, 2005). Por último se conoce que TGF β actúa como un potente quimioatrayente para diversas células de la respuesta inmune como los mastocitos y polimorfonucleares (Gruber *et al.*, 1994; Reibman *et al.*, 1991) (**Figura 11**).

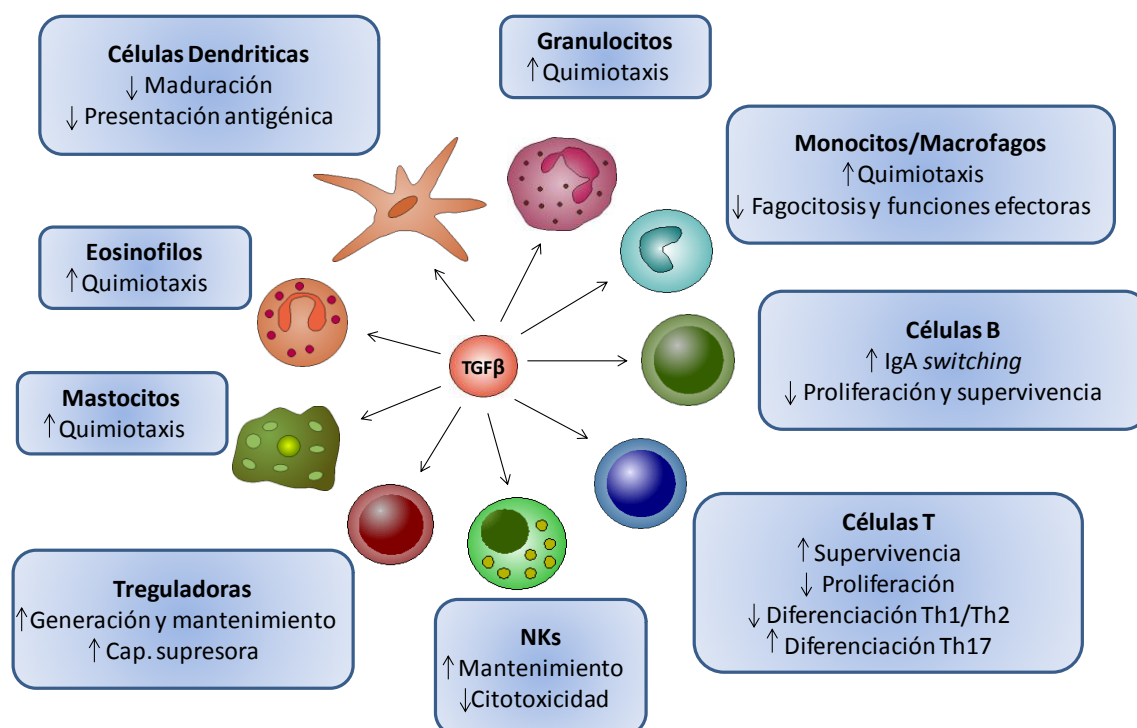


Figura 11. Funciones de TGF β en las distintas células del sistema inmune.

3.9.- Señalización de TGF β en la diferenciación de los linfocitos T-CD4⁺ a los subtipos funcionales Treg/Th17

El papel de TGF β durante la diferenciación de los linfocitos T-CD4⁺ se demostró al observar que la deficiencia o inhibición de TGF β o TGF β RI/II bloquea la diferenciación de células T-CD4⁺ *naïve* tanto a iTreg como a Th17 (Lu *et al.*, 2010). En el caso de la diferenciación a Tregs, la activación de la ruta de los Smads podría jugar un papel más decisivo. NFAT junto con Smad3 se unen a un amplificador en el gen de *foxp3* (Tone *et al.*, 2008). Estudios más recientes mostraron que la ausencia de Smad2 y Smad3 reducía la diferenciación a células iTreg *in vitro* e *in vivo* (Jana *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010), aunque sólo parcialmente, lo que indica que la transducción de señal por TGF β mediante rutas independiente de Smad también están implicadas en este proceso. El grupo de Lu ha demostrado la importancia de la activación de la ruta de las MAPK, en concreto la que afecta a Erk, ya que células deficientes en esta proteína presentan una diferenciación disminuida a iTreg inducida por TGF β (Lu *et al.*, 2010). En cambio la ruta PI3K/Akt tiene un impacto negativo en la diferenciación de Tregs tanto en el timo como en la periferia (Haxhinasto *et al.*, 2008). Por otro lado, el ácido retinoico incrementa la diferenciación a iTreg potenciando la expresión y fosforilación de Smad3 (Xiao *et al.*, 2008).

Lo primero que destacaríamos en la inducción de Foxp3, es la señalización a través del TCR, que es independiente de TGF β y está mediada por el factor NFAT tras estimulación del receptor (Mantel *et al.*, 2006). El estudio molecular del promotor de Foxp3 ha mostrado que existen secuencias reguladoras que contienen motivos de unión además de para NFAT, para componentes de NF- κ B (como c-Rel), Smad3 o Stat5 y también para CREB (*phosphorylated cyclic AMP response element binding*). El reclutamiento de todos estos factores ocurriría de forma secuencial formando los complejos que interaccionan posteriormente para inducir la expresión de Foxp3 tras la activación celular y en presencia de TGF β y otros factores como la IL-2.

También se ha demostrado la importancia, tanto en la periferia como en el timo, de los cambios epigenéticos, como pueden ser la metilación de secuencias CpG o la acetilación de histonas, modificando la accesibilidad de estas regiones para los distintos factores de transcripción como se puede apreciar en la **Figura 12**.

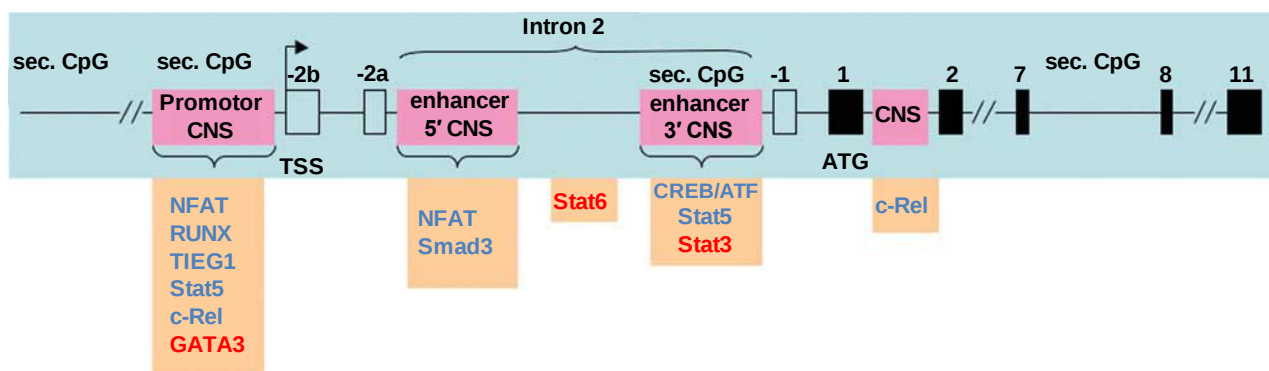


Figura 12. Estructura del gen *Foxp3* murino. El sitio de inicio de la transcripción (TSS) comienza en el exón -2b y solo los exones 1 al 11 son transcritos. En rosa las secuencias conservadas no codificantes (CNS) en el promotor y el intrón 2. Las CNS 5' y 3' en el intrón 2 sirven como sitios reguladores o *enhancer*. Las secuencias CpG muestran lugares de metilación en el gen activo. En los recuadros naranjas aparecen los factores de transcripción que se unen al promotor y a los sitios *enhancer*, en azul los factores que regulan positivamente y en rojo los que lo hacen negativamente.

Para la diferenciación Th17 en cambio, es esencial la colaboración TGF β y citocinas inflamatorias como la IL-6, IL-21 o IL-23. En el caso de TGF β en la diferenciación Th17, no está clara la ruta de señalización implicada. Algunos autores aseguran la independencia de los Smads, ya que la ausencia de Smad-2, 3 y 4 no afecta significativamente a la diferenciación a Th17 *in vitro*, ni a la evolución de la enfermedad en un modelo de EAE dependiente de células Th17 (Yang *et al.*, 2008b; Lu *et al.*, 2010). Por el contrario otros autores le confían un papel importante a Smad2 en la diferenciación Th17 (Malhotra *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2010). Así mismo, en la diferenciación Th17 se han implicado las rutas de señalización por TGF β dependientes de las MAPK, pero en este caso estarían implicadas JNK y p38 y, a diferencia de la inducción a iTregs, Erk no desempeñaría función alguna (Lu *et al.*, 2010).

Pasare y Medzhitov en 2003 ya observaron la regulación negativa que ejercía la IL-6 sobre *Foxp3*, y determinaron que esta inhibición ocurría a través de Stat3. Sabemos que Stat3 compite por la misma región conservada del gen *Foxp3* que Stat5, pero de manera más débil. Así, en presencia de IL-6 la cantidad de Stat3 activo es más alta y desplaza la unión de Stat5 inhibiendo la expresión de *Foxp3* y potenciando la de RoRyT, permitiendo así una diferenciación a Th17 (Yao *et al.*, 2007). Existen otros factores de transcripción que modulan positivamente la diferenciación Th17 como son IRF4 o Batf (Biswas *et al.*, 2010; Schraml *et al.*, 2009). Mientras que el factor de transcripción Runx1 contribuye en ambas diferenciaciones Treg y Th17 (Hu *et al.*, 2007; Zhang, 2008) **Figura 13.**

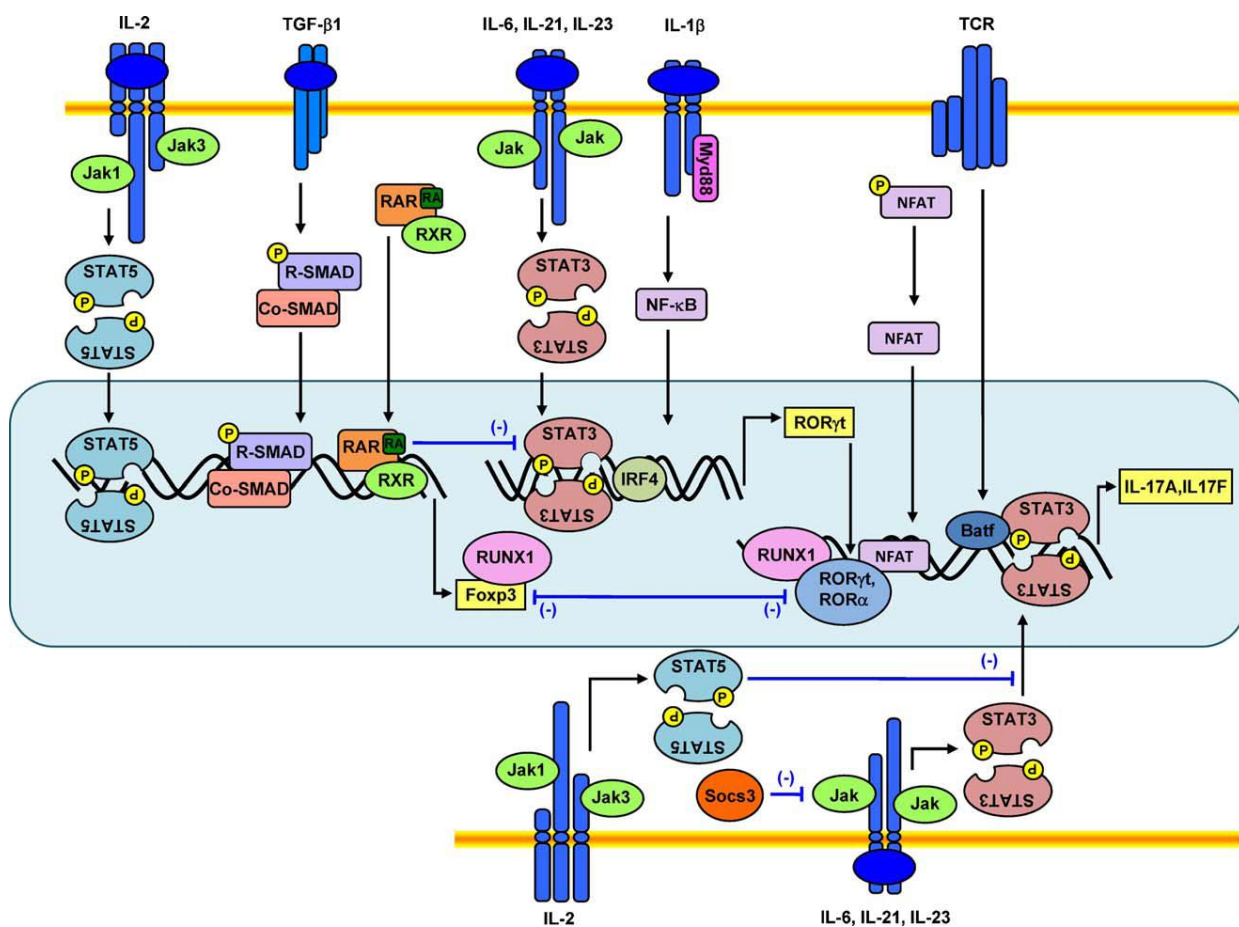


Figura 13. Vías de señalización y factores de transcripción que regulan la diferenciación Th17. Estimulos por el TCR activan el factor NFAT, que regula la producción de IL-17. IL-6, IL-21 e IL-23 inducen la activación de STAT3, el cual a su vez induce la expresión de genes de la IL17 e IL21. STAT3 se une a los genes Rorc y Irf4 y IRF4 co-opera con STAT3 para inducir la expresión de RORgt. La señalización por TGFb1 conlleva la activación de SMADs, aunque el mecanismo por el que promueve tanto iTregs como Th17 sigue siendo bastante desconocido. Una posibilidad es que no provoque señales de inducción sino que solamente atenue la expresión de Tbet, GATA3 y otros factores. La señalización por IL-1 potencia la expresión de IRF4 inducida por IL6 y por tanto promueve diferenciación Th17. Ambos factores RORgt y RORa se unen al gen de la IL17. Al contrario, IL-2, IL-4, IL-27 y IFN-g inhiben la diferenciación Th17 a través de la activación de STAT5, STAT6 y STAT1 respectivamente, aunque los mecanismos no se comprenden completamente. Recíprocamente, STAT5 aumenta la expresión de Fcγ3. Runx1 se asocia tanto con RORgt como con Fcγ3 y posiblemente regula la diferenciación entre los linajes iTreg y Th17. Algunas citocinas también upregulan Socs3 el cual atenúa la activación de STAT3. K. Hirahara et al. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010.

4.- AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La enfermedad autoinmune se puede definir como una condición patológica en la que se produce un daño estructural y/o funcional como consecuencia de una respuesta mediada por células y/o Ac contra componentes del propio organismo. No podemos comprender el fenómeno de autoinmunidad sin definir antes la tolerancia inmunológica, un mecanismo por el cual las células inmunocompetentes no responden frente a antígenos propios (auto-Ag). Esta capacidad de tolerar lo propio es adquirida por cada nuevo individuo y se lleva a cabo por distintos mecanismos como la inactivación, ignorancia o delección, que neutralizan a las células potencialmente reactivas frente a auto-Ags (linfocitos T ó B autoreactivos). Si estos procesos responsables del mantenimiento de tolerancia fracasan, se producen reacciones inmunológicas erróneas y excesivas, apareciendo una serie de trastornos que conocemos como enfermedades autoinmunes. La autoinmunidad no se produce por un fallo general en los mecanismos generadores de tolerancia, sino por fallos puntuales en dichos mecanismos frente a ciertos autoantígenos, específicos de cada una de las diferentes enfermedades autoinmunes. No se sabe la causa concreta que induce el comienzo de estas patologías, pero sí que las enfermedades autoinmunes tienen una etiología poligénica y multifactorial. Por ejemplo, está muy estudiada la relación entre varias enfermedades autoinmunes y determinados haplotipos MHC, también son importantes las alteraciones en genes que codifican para moléculas reguladoras del ciclo celular y la apoptosis, moléculas coestimuladoras de linfocitos, desregulación de factores del complemento, etc. También influyen factores ambientales (en patologías autoinmunes como la granulomatosis de Wegner que necesitan una infección previa para su desarrollo). La principal característica que diferencia a las respuestas autoinmunes del resto es que en éstas generalmente el auto-antígeno persiste y el sistema inmunitario es incapaz de acabar con él. Por ello este tipo de enfermedades suelen ser crónicas.

Existen más de 80 enfermedades de origen autoinmune que afectan al 5% de la población y constituyen el tercer grupo de enfermedades con más prevalencia después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. En la práctica clínica estas enfermedades se clasifican en función de si la respuesta inmune está dirigida frente a antígenos de un solo tejido (órgano-específicas) o frente a autoantígenos ubicuos (sistémicas). En el caso de las enfermedades autoinmunes sistémicas que pueden evolucionar en cualquier parte del cuerpo como la artritis reumatoide, la diabetes mellitus-insulino dependiente, el lupus eritematoso y la miastenia gravis y

que en algunos casos incluso no se conocen los autoantígenos diana como la esclerosis múltiple, se piensa que la respuesta autoinmune desarrollada es muy similar en todas ellas, estando asociadas a gran variedad de autoanticuerpos y células T activadas, con diferentes lesiones tisulares y pérdida de funciones fisiológicas normales.

4.1.- Artritis reumatoide (AR)

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune crónica que sufre el 1% de las personas adultas y que a pesar de afectar fundamentalmente al tejido sinovial de las articulaciones, puede cursar con diversas manifestaciones sistémicas (Harris, 1990; Riise *et al.*, 2000; Carmona *et al.*, 2002; Firestein *et al.*, 2003). Se caracteriza fundamentalmente por una inflamación y proliferación de la membrana sinovial (sinovitis) con frecuente destrucción y deformación del cartílago y el hueso. Como otras enfermedades autoinmunes, la AR tiene un modo de herencia complejo y aunque su etiología es desconocida, es probable que la susceptibilidad sea de carácter poligénico, en respuesta a un factor ambiental, probablemente de tipo infeccioso (Birkenfeld *et al.*, 1990; Hicks *et al.*, 1992; Huizinga *et al.*, 2002).

La AR implica la existencia de auto-anticuerpos circulantes y deposición de inmunocomplejos en las articulaciones, además de la infiltración de células mononucleares inflamatorias con la participación de células T-CD4+ autoreactivas y antígeno-específicas. Su activación conlleva la síntesis y liberación de distintas citocinas como IL-2, IL-6, IL-1 β , TNF α , IFN γ y GM-CSF, localizando la inflamación linfocitaria principalmente en la membrana sinovial. Todo ello da lugar a la formación del *pannus*, un tejido de granulación vascular compuesto por células sinoviales proliferadas, pequeños vasos sanguíneos, proteínas estructurales, proteoglicanos y células inflamatorias, que poco a poco infiltrará y destruirá el cartílago y el hueso adyacente. Los linfocitos T autoreactivos también fomentan la proliferación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas productoras de autoanticuerpos.

4.2.- Artritis inducida por colágeno (CIA)

Es el modelo experimental de artritis reumatoide más utilizado y aceptado por la comunidad científica. Se utilizan animales que desarrollan inflamación articular, frecuentemente erosiva y acompañada de *pannus*, que puede progresar a anquilosis

tras la inyección subcutánea de colágeno autólogo o heterólogo emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) (Courtenay *et al.*, 1980).

Es frecuente el hallazgo de infiltrado sinovial compuesto por células T activadas, el aumento de expresión de moléculas MHC de clase II por las células sinoviales y el desarrollo de un *pannus* que contiene macrófagos activados, linfocitos y polimorfonucleares.

La CIA se desarrolla en ratones con un haplotipo H-2^a y H-2^r del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), siendo la región de clase II (I-A) del MHC la que determina esta asociación. En la mayoría de estudios se emplean las cepas DBA/1 (H-2^a) y B10.RIII (H-2^r).

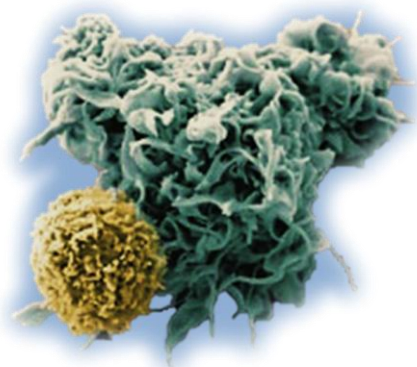
Tras la inmunización, el colágeno es presentado a las células T-CD4⁺ *naïve* en los ganglios linfáticos regionales y estas se diferencian a subpoblaciones efectoras. El papel de los linfocitos T-CD4⁺ en la CIA viene determinado, no solo por la asociación al MHC de clase II, sino por la ausencia total de artritis cuando se eliminan las células T-CD4⁺, con Ac monoclonales (AcM) citotóxicos (Brand *et al.*, 2003).

Hasta hace poco tiempo, tanto la CIA como la encefalitis alérgica experimental (EAE) se consideraban prototipos de enfermedades Th1, es decir, aquellas mediadas por linfocitos T-CD4⁺ productores de IFN γ . Sin embargo, hoy en día sabemos que en ambos modelos las células patogénicas tienen un fenotipo productor de IL-17 (Th17) y no tanto de IFN γ (Harrington LE, 2005).

Los linfocitos B también juegan un papel destacado en la CIA, como demuestra la resistencia a la artritis en animales mantenidos sin células B, mediante tratamiento con un Ac anti- μ desde el nacimiento. En la cavidad articular, las células B intervienen activamente en la presentación del colágeno nativo a las células T-CD4⁺ auto-reactivas. A este nivel también se produce la activación de células B específicas, productoras de Ac. Con la llegada de los Ac y las células T-CD4⁺ activadas a las articulaciones tiene lugar la activación del complemento y la migración al foco de células de la respuesta inmune innata, con la consecuente liberación de citocinas pro-inflamatorias como IL1 β , TNF α , IL-6 e IL-17A que potencian el proceso, iniciándose la destrucción tisular (Cho *et al.*, 2007). Además, los Ac anti-CII tienen capacidad patogénica propia, ya que su inyección en animales no inmunizados transfiere la artritis. La subclase de Ac anti-CII es determinante, siendo los isotipos IgG2a e IgG2b, fijadores de complemento, los más artritogénicos.

Al mismo tiempo, para contrarrestar la respuesta patogénica, se ponen de manifiesto mecanismos protectores como la supresión mediada por células Treg, que juegan un papel importante en el control del desarrollo de artritis y otras enfermedades autoinmunes, como se demuestra con la aparición de una patología autoinmune severa al practicar una timectomía neonatal en ratones de forma que se elimina esta población; o con la eliminación o mutaciones del gen de Foxp3, factor de transcripción esencial en la función y diferenciación de las Tregs, tanto en ratones como en humanos (Sakaguchi *et al.*, 1995; Chatila *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2001; Hori *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003). Además la liberación de citocinas inmunomoduladoras como TGF β e IL-10, es uno de los principales mecanismos de supresión descritos con importancia *in vivo* (Cho *et al.*, 2007; Gonzalez-Rey *et al.*, 2006; Platten *et al.*, 2009).

II.OBJETIVOS

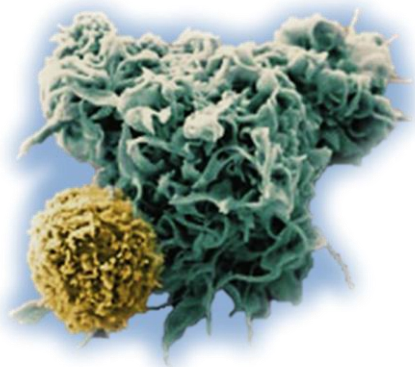


II. OBJETIVOS

A pesar de la gran cantidad de información publicada en los últimos años en referencia a las poblaciones de células Tregs y Th17 y al papel de TGF β en su diferenciación y función, poco se conoce de los mecanismos moleculares que regulan a esta población celular, especialmente *in vivo*. El protagonismo de ciertas citocinas en el entorno de TGF β parece crucial en la diferenciación de linfocitos T-CD4⁺ hacia los subtipos funcionales Treg o Th17 y a la aparición y evolución de síndromes autoinmunes. Sin embargo, recientemente nuestro grupo ha planteado la existencia de un posible sensor molecular, intrínseco a la propia señalización de TGF β , por el que es posible influir a diferentes niveles en la biología de las células Treg (Iglesias *et al.*, 2013). Con esta premisa nos propusimos la búsqueda y caracterización de proteínas que participen en este hipotético sensor molecular de la señalización por TGF β . Identificamos a BAMBI como una posible diana para la regulación de esta ruta de señalización y nos planteamos el abordaje de los siguientes objetivos:

1. Estudiar la expresión del pseudoreceptor BAMBI en el sistema inmune y más concretamente en linfocitos T-CD4⁺.
2. Valorar el efecto en la señalización por TGF β en ausencia de este inhibidor en linfocitos T-CD4⁺.
3. Evaluar el papel de BAMBI en la regulación de la homeostasis linfocitaria; en particular sobre el desarrollo y función de los linfocitos Tregs y Th17.
4. Determinar el efecto de la ausencia de este inhibidor de TGF β sobre el desarrollo de autoinmunidad.

III.MATERIAL Y MÉTODOS



III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Ratones

Para la realización del presente trabajo se emplearon las siguientes estirpes de ratones:

Ratones consanguíneos:

- *B10.RIII (B10)*. Expresan el haplotipo H-2^{r/r} y son susceptibles al desarrollo de CIA inducida por colágeno de tipo II bovino. Adquiridos en Harlam-Olac (Barcelona).
- *C57BL/6 (B6)*. Harlam-Olac (Barcelona). Utilizados como controles, con fondo genético no predispuesto al desarrollo de autoinmunidad ni de artritis por inmunización con colágeno de tipo II bovino.

Ratones deficientes (gene knock-out):

- *B6 deficientes en BAMBI: (BAMBI^{-/-})*. Cedidos generosamente por el Dr. Juan Carlos Izpisúa-Belmonte en el Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, California, USA). Los ratones fueron generados por recombinación homóloga en células madre embrionarias para crear la línea 129SvJ x C57BL/6 en la que los exones 2 y 3 del gen BAMBI fueron eliminados y sustituidos con un marcador de resistencia a neomicina. El exón 1 restante contiene la región 5' no traducida y los primeros 14 aminoácidos que son parte del péptido señal característico de proteínas de membrana o solubles. Los ratones mutantes fueron cruzados con C57BL/6 durante más de 12 generaciones para transferir la mutación a este fondo genético. El cruzamiento entre BAMBI^{+/-} resultó en mutantes homocigotos. Los experimentos fueron realizados en ratones BAMBI^{-/-} y BAMBI^{+/+} **Figura 1**.

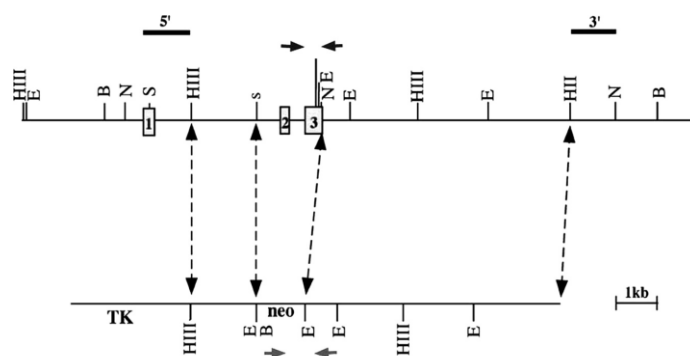


Figura 1. Disrupción dirigida del gen *bamby* por recombinación homóloga. Arriba el locus Wt de *bamby* con los 3 exones (recuadrados 1-3). Abajo, vector en el que se han reemplazado los exones 2 y 3 con el marcador de resistencia a neomicina (neo). Las flechas indican la posición de los *primers* usados para el genotipado.

- *B10 deficientes en BAMBI (B10.BAMBI^{-/-})*. Fueron obtenidos en nuestro laboratorio mediante retrocruzamiento sucesivo de ratones B6.BAMBI^{-/-} con ratones B10, hasta llegar a la 10^a generación. Después de cada cruce, los heterocigotos BAMBI^{+/-} se seleccionaron por amplificación del ADN genómico extraído de la cola de los ratones (*ver más adelante*). Los heterocigotos B10.BAMBI^{+/-} finalmente obtenidos se cruzaron entre sí, seleccionándose los homocigotos B10.BAMBI^{-/-}, en los cuales se comprobó la presencia de un haplotipo H-2^{r/r} que les hacía susceptibles a CIA con col-II bovino.

Otros ratones

- *Athymic Nu/Nu*: denominados **Nude**. Portan una mutación que afecta al desarrollo de la tercera bolsa faríngea que impide la formación de epitelio cortical del timo, por lo que no generan linfocitos T convencionales.

2.- Mantenimiento y manipulación de los animales

Todos los animales empleados en el presente trabajo fueron mantenidos y manipulados en instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. Las cepas convencionales de ratones se mantuvieron en cuartos con sistemas de ventilación y renovación de aire no estéril. Los animales inmunodeficientes (por ej. Nu/nu) se alojaron en cuartos libres de patógenos, con agua y comida esterilizados. La manipulación se realizó siguiendo en todo momento la normativa del Real Decreto 1201/2005.

Cuando fue necesaria una anestesia ligera, los ratones fueron introducidos en una cámara con éter dietílico (Panreac), dentro de una campana de extracción de gases. En el caso de la inmovilización para tomar radiografías de las patas, se les inyectaron intraperitonealmente (i.p.) 50-80 µl de una mezcla anestésica compuesta por 3 mg de Ketamina (Ketolar®, Parke-Davis), 300 ng de Diazepam (Valium®, Roche, Madrid, España) y 60 ng de Atropina sulfato (B.Braun Medical, Madrid-España) por animal (aprox. 30 g de peso corporal).

3.- Análisis de la fosforilación de Smad3 *in vitro*

Para ello purificamos linfocitos T-CD4⁺ por “*Cell sorting*” con ayuda de un citómetro y separador celular FACSaria (Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) y cultivamos 0.5x10⁶ células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio RPMI completo con las siguientes condiciones: nada, anti-CD3 murino (clon 145-2C11, Biolegend; 1 µg/pocillo) más anti-CD28 murino (clon 37.51, BD biosciences; 0,5 µg/pocillo) y anti-CD3 más anti-CD28 más 2 dosis de TGFβ (0.5 y 2 ng/ml) durante 24 horas. Para medir la cantidad de Smad3 fosforilado (pSmad3) ó activo utilizamos el Kit “AlphaScreen SureFire SMAD3 (p-Ser423/425)” de PerkinElmer según el protocolo estándar de la casa comercial. Este kit contiene anticuerpos que reconocen el epítipo fosforilado Ser423/425 y otro epítipo distal en la proteína Smad3. Estos anticuerpos están unidos a unas “*beads*” que en proximidad se excitan mutuamente y producen una emisión de 520-620nm que procedimos a leer en el lector de placas “*Envision*” de PerkinElmer **Figura 2**.

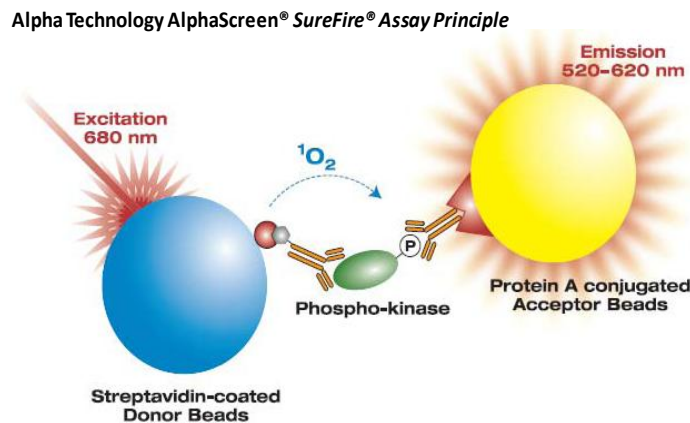


Figura 2. Medida de la fosforilación de Smad3. La tecnología AlphaScreen SureFire permite la detección de proteínas fosforiladas en lisados celulares de forma cuantitativa y específica. Complejos “sándwich” de anticuerpos se forman en presencia del ligando, estos a su vez van capturados por una *bead* donadora y otra receptora que se encuentran en proximidad de manera que la excitación de la donadora provoca la liberación de una molécula de oxígeno que induce sobre la receptora la emisión de luz a 520-620nm.

4.- Caracterización fenotípica y genotípica

Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo

La diferenciación de los haplotipos H-2^r y H-2^b en las progenies de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} se evaluó en linfocitos de sangre periférica mediante citometría de flujo. Para ello, a las 5-6 semanas de vida de los animales, se extrajeron 100 µl de sangre en tubos que contenían 100 µl de heparina sódica (Heparina Mayne 5%, 50 mg/ml, Mayne Pharma) diluida a 1 mg/ml en PBS. Las células, (aprox. 10⁶) se lavaron con PBS a 2000 rpm, 3' y 4°C, y se incubaron con suero normal de ratón (NMS) para bloquear uniones inespecíficas a receptores de Fc (FcRs). Posteriormente, se añadieron los siguientes anticuerpos monoclonales (AcM) de *BD Bioscience*: FITC-anti-mouse H-2K^b, que reconoce el haplotipo H-2^b, PE-anti-mouse I-E^k que reconoce el haplotipo H-2^r y APC-anti-mouse B220 para marcar linfocitos B. Se incubaron durante 20' a 4° y oscuridad, y después se lavaron x2 con PBS, para eliminar el exceso de Ac. Para fijar los linfocitos, y a su vez lisar los glóbulos rojos, se añadió a la suspensión celular paraformaldehído (PFA) a una concentración final del 1%, incubando durante 8' a temperatura ambiente (RT), y lavando posteriormente con PBS-0,03% saponina. Finalmente las células fueron resuspendidas en 250 µl de PBS para ser analizadas en un citómetro de flujo FacsCanto, utilizando el FacsDiva como programa de análisis (Beckton-Dickinson, Palo alto, CA, USA). Durante el análisis, las células muertas se excluyeron siguiendo los parámetros de tamaño y granularidad, y la expresión de los diferentes alelos se determinó por comparación de la señal de fluorescencia obtenida con los linfocitos de ratones control C57BL/6 y B10RIII **Figura 3**.

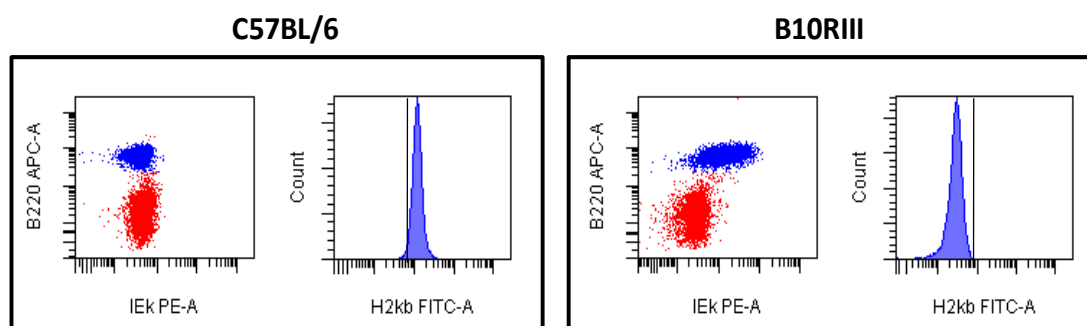


Figura 3. Análisis de la expresión de los haplotipos H-2^b para el ratón B6 y H-2^r para el ratón B10RIII por citometría de flujo en leucocitos sanguíneos. El AcM que reconoce el haplotipo r (I-E_[k]) conjugado a PE se combinó con el Ac que reconoce el B220 murino en APC. En el histograma se representa el marcaje del AcM que reconoce el haplotipo b (H2kb) conjugado a FITC. En el panel de la izquierda se muestra un ratón B6 y en el panel de la derecha a un ratón B10RIII.

Caracterización genotípica de los ratones deficientes en BAMBI mediante PCR

Para identificar los ratones deficientes en *BAMBI* se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA genómico, el cual se extrajo de una muestra de 0,3-0,5 cm de la cola de ratones a las 4-5 semanas de edad, previa anestesia, utilizando el protocolo del “High Pure PCR Template preparation kit” (Roche).

Se utilizaron 2 μ l de DNA por reacción en un volumen final de 25 μ l, y las siguientes concentraciones finales de reactivos: 0,02 U de Biotaq DNA pol (Bioline), 2 mM de $MgCl_2$ (Bioline), 0,2 mM dNTPs (Bioline) y 1 μ M de cada uno de los cuatro *primers*. Los *primers* 1 y 2 fueron diseñados para amplificar un fragmento de 398 pb de la región eliminada del alelo WT (*forward*, TGTGATAGCGGTCCCATTGC y *reverse*, CCAGATAAAAGTGCTCCTGTCAGC). Y los *primers* 3 y 4 que amplifican un fragmento del *casette* de neomicina insertado (*forward*, 5'-TTCGCCAATGACAAGACGCTGG-3' y *reverse*, 5'-GGACACAAAGAACCCTGGGAAAG-3'). Las muestras se sometieron al siguiente protocolo de amplificación: 94°C-3'; 40 ciclos (95°C-30"; 58°C-30"; 72°C-30"); 72°C-10' y mantenerlo a 4°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% [diluída en TBE-0,5% que contenía un volumen 1:20.000 de una solución marcadora de ácidos nucleicos (RedSafe, Intron Biotechnology)] en presencia de un marcador de peso molecular (*HyperLadder I*, Bioline). Al someter al gel a radiación ultravioleta (UV) en un equipo documentador de imágenes (Gel Doc, BioRad), en los ratones B6 se observó una banda de 398 pares de bases (pb), en los *BAMBI*^{-/-} una de 524 pb y ambas en el caso de los animales heterocigotos **Figura 4**.

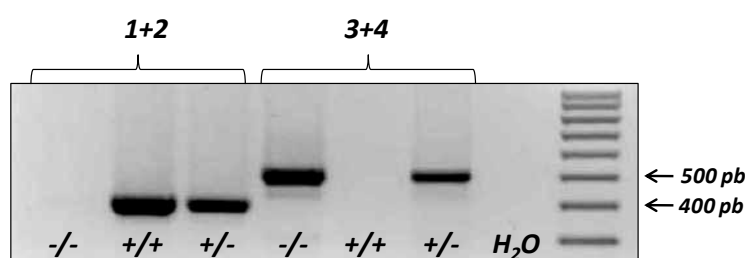


Figura 4. Caracterización de los ratones deficientes en BAMBI. Calles 1-3: PCR con *primers* 1 y 2; calles 4-6: PCR con *primers* 3 y 4. Calle 7 PCR control sin DNA. Calle 8: marcador de peso molecular (*hyperladder I*, Bioline). El orden de los DNAs experimentales se muestra en la figura.

5.- Inducción y valoración clínica y radiológica de la artritis

Inducción

El modelo de artritis inducida por colágeno (*Collagen-induced arthritis*: CIA), se desarrolló mediante inmunización con colágeno bovino tipo II (CII) a machos B10RIII (H-2^r). Para su administración, el CII (Chondrex, Redmond, Washington, USA), se disolvió en ácido acético 0,05 M a una concentración de 2 mg/ml, manteniéndolo en agitación constante al menos 12 h a 4°C. Momentos antes de su uso se realizó una emulsión fría con un volumen similar de adyuvante completo de Freund (CFA, 4mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*; Chondrex, Redmond, Washington, USA) y se inyectaron 150 µl (150 µg de CII) por vía subcutánea (s.c.) en la base de la cola de ratones de entre 8 y 12 semanas de edad.

Valoración clínica

Para valorar el comienzo de la artritis, así como el desarrollo y evolución de la misma, los ratones fueron examinados visualmente una vez por semana desde la tercera hasta la octava post-inmunización (p.i.), momento en que se procedió a su sacrificio. La severidad de la patología en cada una de las cuatro extremidades se determinó mediante un protocolo previamente descrito (Wooley *et al.*, 1985), que gradúa la artritis en cada pata en una escala de 0 a 3 de la siguiente manera: **0**= normal, **1**= enrojecimiento e inflamación de las articulaciones de los dedos, **2**= enrojecimiento e inflamación del carpo/tarso, **3**= anquilosis de la articulación afectada. El *score* clínico que se muestra, se obtuvo sumando los valores de afectación en cada una de las patas, de modo que el rango de severidad de la artritis en cada animal varía entre 0 (no artritis) y 12 (artritis con anquilosis en las cuatro extremidades).

Valoración radiológica

Se tomaron radiografías de las patas a semana octava p.i. en ratones anestesiados con una mezcla que contenía ketamina, diazepam y atropina, detallada anteriormente. Para ello se utilizó una fuente de Rayos X de 70 Kw y con una exposición de 90 ms (Trophy Irix X-Ray System; Kodak Spain, Madrid). Posteriormente fueron analizadas con ayuda del programa *Trophy Digital Imaging system*, graduando en las imágenes la severidad de 4 lesiones radiológicas diferentes; **a**) Inflamación de tejidos blandos (edema), **b**) osteopenia yuxtaarticular debida a alteraciones en la densidad ósea, **c**) estrechamiento o desaparición del

espacio articular, y **d)** irregularidades de la superficie ósea debido a la presencia de erosiones marginales o neoformación de tejido óseo periosteal. La extensión de cada lesión (local: afectación de un dedo o una articulación en el carpo/tarso, o difusa: afectación de dos o más dedos y/o dos o más articulaciones en el carpo/tarso) fue valorada de forma individual en cada una de las patas y graduada de 0 a 2 de la siguiente forma: **0**= ausencia; **1**= local; y **2**= difusa. El *score* clínico que se muestra, se obtuvo sumando los valores de afectación en cada una de las patas.

6.- Procesamiento y estudio histológico de los tejidos

Estudio de las alteraciones articulares

Para determinar el grado de afectación articular tras la inducción de CIA se realizaron estudios histológicos de las patas. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y sus patas delanteras y traseras fueron fijadas en formol tamponado al 4% durante 24 h. A continuación se pasaron a tubos que contenían una solución decalcificadora durante 48 h y posteriormente se realizó una post-fijación en formol 24 h más. Al quinto día las muestras fueron deshidratadas en alcohol y xilol a concentraciones crecientes desde el 70% hasta el 100% y finalmente se incluyeron en parafina. Secciones de 5 μ m de grosor fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) usando métodos convencionales (Bancroft and Bellairs, 1977) y se valoraron con un microscopio óptico (Nikon, Eclipse E400).

7.- Producción y Purificación de anticuerpos monoclonales (AcM)

Se produjeron y purificaron AcMs a partir de las siguientes líneas de hibridomas secretores: IgG₁ de rata anti-CD25 murino (PC61) e IgG₁ murino anti-TGF β 1 murino (1D11).

Producción

Las células se expandieron mediante cultivo en DMEM suplementado con 5% FCS y 1% glutamina. En ratones atímicos Nude (*Nu/Nu*), previamente estimulados con pristano (2, 6, 10, 14-tetrametil-pentadecano, Sigma), se inyectaron las células del hibridoma por vía i.p., a razón de 5-10x10⁶ células/ratón. Cuando fue evidente la existencia de ascitis se extrajo esta mediante punción peritoneal bajo anestesia.

Se hizo un pool con la ascitis recogida, se centrifugó a 3000 rpm durante 10', se filtró y se conservó a -20°C hasta el momento de su purificación y uso.

Purificación de los AcMs. Método del ácido caprílico

El protocolo se inició añadiendo tampón acetato-acético 60 mM, pH 4 en un volumen 4:1 en relación a la cantidad de ascitis de la que se partía y se ajustó el pH a 4,5. A continuación se añadió goteando ácido caprílico (*Octanoic acid*, Sigma) a razón de 25 µl por cada ml de la solución anterior y se sometió a agitación magnética 30' a RT, consiguiendo así romper la emulsión de los lípidos (la solución tomó un aspecto blanquecino con micelas). Tras centrifugar 30' a 12000 rpm y 4°C, se recogió el sobrenadante en un vaso de precipitados, se añadió sobre éste PBS 10X en relación 1:9 y se ajustó el pH a 7,4. En este punto se procedió a precipitar el AcM añadiendo lentamente y en agitación el mismo volumen de sulfato amónico saturado (SAS) filtrado a pH 7 (ver apartado 18.3) agitando durante 30'-o/n a 4°C. Tras una centrifugación de 30' a 12000 rpm y 4°C se desechó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en PBS en el volumen deseado. Dicha disolución fue dializada contra PBS en membranas de diálisis (*Dialysis tubing, high retention, 40 mm x 25 mm*; Sigma) durante 3 días. Finalmente se determinó la concentración de anticuerpo calculando la densidad óptica a 260 nm con un espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

8.- Tratamiento *in vivo* con anticuerpos monoclonales

Tratamiento con el AcM IgG1 de rata anti-CD25 (PC61) murino

La eliminación de las células Treg *in vivo* se realizó mediante un tratamiento con el AcM citolítico IgG₁ de rata anti-CD25 (PC61) murino, que consistió en la administración desde el día 13d p.i. hasta el momento del sacrificio y a días alternos de 0,1 mg (en 200 µl) del AcM purificado por vía i.p. La eficacia del tratamiento se verificó mediante citometría de flujo en células mononucleares de sangre al menos dos veces durante el transcurso del mismo (**Figura 5**).

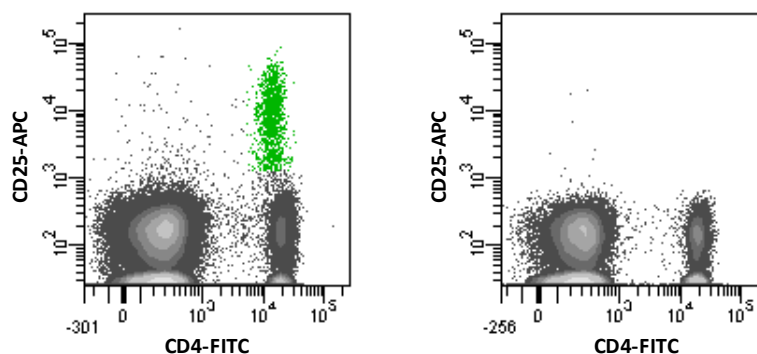


Figura 5. Comprobación del tratamiento *in vivo* con el AcM anti-CD25 (PC61), por citometría de flujo en sangre. Las células sanguíneas se marcaron con una combinación de AcMs anti-CD25 (PC61)-APC y anti-CD4-FITC. En el panel de la izquierda se muestra la expresión de estos marcadores en un ratón no tratado y en el panel de la derecha la de un ratón 15 d después del inicio de tratamiento con el AcM anti-CD25 i.p., observándose la pérdida completa de la población CD4⁺CD25⁺.

Tratamiento con el AcM IgG1 murino anti-TGFβ1 (1D11) murino

Para bloquear *in vivo* la acción del TGFβ, se administró el AcM IgG₁ murino anti-TGFβ1 (1D11) murino localmente en la pata de los ratones. Para ello, se inyectaron en días alternos 0,08 mg (en 50 μl) de dicho AcM por vía s.c. en la almohadilla plantar. La duración del tratamiento siguió un patrón similar al del AcM anti-CD25.

Tratamiento con complejos IL-2-IL-2 AcM

Para la expansión *in vivo* de células Treg se inyectaron complejos de IL-2 recombinante murina (*Peprotech*) y AcM anti-IL2 (clon *JES6-1A12*, *eBioscience*). La citocina y el anticuerpo se mezclaron a razón de un ratio de 5:1 de anticuerpo:citocina y se incubaron 30 minutos a 37°C. Se inyectaron i.p. 6μg del complejo en PBS durante 3 días. A los 5 días se analizó la población de Tregs en bazo y ganglios.

9.- Obtención de muestras sanguíneas y suspensiones celulares

Muestras sanguíneas (suero y sangre)

Suero. Tras anestesiarse a los ratones con éter dietílico (Panreac) se extrajeron unos 200 μl de sangre mediante la punción con un capilar en el seno retroorbitario. Esta sangre se mantuvo durante toda la noche a 4°C, o durante unas horas a RT para

permitir la retracción del coágulo, obteniendo posteriormente el suero por centrifugación de la misma durante 5' a 6500 rpm. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

Sangre. Para estudios de citometría de flujo en sangre, se recogieron aproximadamente unos 200 µl en tubos que contenían 100 µl de heparina sódica (Heparina Mayne 5%, 50 mg/ml, Mayne Pharma) a una concentración de 1 mg/ml. Tras un lavado con 2 ml PBS/tubo, se descartó el sobrenadante y se tomaron 75 µl del pellet de células (aprox. 10^6 cls) para pasarlos a tubos de citometría.

Suspensiones celulares

Cuando se realizaron estudios de citometría de flujo o cultivos celulares de órganos linfoides (bazo y/o ganglios), se utilizaron suspensiones celulares de los mismos obtenidas siguiendo el protocolo descrito a continuación:

Tras sacrificar al ratón por dislocación cervical, los órganos fueron extraídos y sumergidos en PBS a 4°C. A continuación se procedió a su maceración en PBS estéril y las suspensiones celulares se lavaron en PBS-1%BSA mediante centrifugación a 2000 rpm, 3' y 4°C. En el caso de suspensiones obtenidas del bazo, se lisaron los eritrocitos mediante su tratamiento con una solución de lisis Tris-NH₄Cl pH 7,5 durante 5' a RT, y tras dos lavados, las células se resuspendieron en PBS-1%BSA para su recuento. Finalmente se contaron las células vivas con una cámara de Neubauer, descartando las muertas por tinción con Azul Tripan (Gibco).

10.- Cuantificación de anticuerpos en suero. ELISA

Ac anti-CII

La valoración de los niveles de Ac anti-CII circulantes en los ratones inmunizados con CII-CFA se realizó mediante la técnica ELISA. Para ello, placas de ELISA (Maxisorb; Nunc, Wiesbaden, Germany) fueron incubadas durante toda la noche (o/n) a 4°C con CII (1 µg/ml, 100 µl/pocillo), utilizando un buffer específico que favorece la unión a placa. Tras lavados con PNT las placas fueron incubadas durante al menos 2 h con solución de bloqueo (PNT-1%BSA) para saturar los sitios de uniones inespecíficas y después de lavar de nuevo con PNT, se añadieron los sueros experimentales (100 µl/pocillo) que fueron testados por duplicado en un rango de diluciones entre 1:1000 y 1:2000 dependiendo de la inmunoglobulina a detectar. Como control positivo y para la realización de la curva patrón se utilizó un

pool de sueros testado previamente con niveles elevados de anticuerpos anti-CII. Tras 3 h de incubación a RT, las placas, previamente lavadas, fueron incubadas durante 3 h con Ac específicos frente a IgG₁ e IgG_{2a} murinas conjugados a fosfatasa alcalina (Sigma). La reacción enzimática se valoró tras añadir 100 µl/pocillo de una dilución de pNPP (*4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate*, Sigma) como sustrato para la fosfatasa alcalina) utilizando un equipo Multiskan® FC (Thermo Scientific) con un filtro de 405 nm. Los datos obtenidos, a los que se les restó el blanco, fueron representados en unidades arbitrarias de densidad óptica (D.O.).

11.- Caracterización de las poblaciones linfocitarias de los órganos linfoides

Las poblaciones linfocitarias en los órganos linfoides de ratones de todas las estirpes estudiadas se analizaron mediante citometría de flujo. 10⁶ células de las diferentes suspensiones celulares fueron incubadas durante 10' a RT con 40 µl de una dilución 1:100 del sobrenadante de cultivo IgG_{2b} de rata anti-FcγRII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2), con idea de bloquear los receptores de Fc. Posteriormente, se añadieron 50 µl de las diluciones apropiadas (en PBS) de los diferentes AcMs que reconocían moléculas de la superficie celular conjugados a diferentes fluorocromos: FITC (fluoresceína isotiocianato), PE (ficoeritrina), PerCP (peridín-clorofila a-proteína), APC (aloficocianina) o PB (azul pacífico). Tras una incubación de 30' a 4°C en oscuridad, las células se lavaron dos veces con PBS a 2000 rpm. En el caso del marcaje de proteínas intracelulares (Foxp3, Helios, IL-17A, IFNγ), las células, tras el marcaje de superficie, fueron incubadas con 200µl de una solución fijadora/permeabilizadora [(mezcla de diluyente y concentrado (*Fixation/permeabilization diluent and concentrate*, eBioscience) en relación 3:1, en el caso de Foxp3 y Helios; y *Fixation and permeabilization solution* (Cytofix/Cytoperm, BD), en el de la IL-17A y IFNγ] a 4°C durante 30'-o/n. Tras un lavado con 2ml de buffer de permeabilización (*10X permeabilization buffer*, eBioscience; diluido a 1X en dH₂O) las suspensiones celulares fueron incubadas con 25 µl de los AcMs diluidos en buffer de permeabilización durante 30' a 4°C.

Después del marcaje (extracelular, intracelular o ambos), las células fueron resuspendidas en 250 µl de PBS y conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis, que fue realizado con un citómetro de flujo FACScanto (Becton-Dickinson, Palo Alto, CA, USA). En general se adquirieron 3-4x10⁴ células en la región de

células mononucleares viables acotada en base a los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC). El estudio fenotípico de las poblaciones linfocitarias se realizó utilizando el programa FACS Diva, en base al perfil de expresión simultánea de un conjunto de marcadores. Cuando fue necesario conocer el número total de células de una determinada subpoblación (con un fenotipo característico) en un tejido u órgano concreto, se calculó extrapolando el porcentaje de dicha población, obtenido mediante citometría de flujo, al número total de células viables contadas utilizando una cámara de Neubauer.

<i>AcM</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Clon</i>	<i>Fluorocromo</i>
Anti-CD3ε murino	IgG ₁ , κ de hámster	145-2C11	APC
Anti-CD4 (L3T4) murino	IgG _{2b} , κ de rata (Lewis)	GK1.5	FITC/PerCp
Anti-CD25 murino	IgG ₁ , λ de rata	PC61.5	APC/FITC
Anti-CD44 (Pgp-1) murino	IgG _{2b} , κ de rata	IM7	PE
Anti-CD62L murino	IgG _{2a} , κ de rata (F344)	MEL-14	FITC
Anti-Foxp3 de rata/ratón	IgG _{2a} , κ de rata	FJK-16s	PE
Anti-Helios murino/humano	IgG de hámster	22F6	PB
Anti-IL-17A murina	IgG ₁ , κ de rata	TC11-18H10	PE
Anti-IFNγ murino	IgG ₁ , κ de rata	XMG1.2	FITC/PE
Anti-CD8a murino	IgG _{2a} , κ de rata	53-6.7	PE/Cy7
Anti-IL-22 murina	IgG policlonal de Cabra	Poly5164	PE

Tabla1 . AcMs utilizados para caracterizar las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo. Fueron adquiridos en BD Pharmingen (CD4,CD8, CD25, CD44, IL-17A, IFNγ), eBioscience (CD3, Foxp3) y Biolegend (CD62L, Helios y IL-22).

12.- Purificación celular

Para realizar estudios de diferenciación, funcionalidad *in vitro* de forma concreta y específica, fue necesaria la separación de diferentes subpoblaciones celulares con una pureza elevada.

Purificación de células T efectoras, Treg y T-CD4+ *naïve*

En este caso, tras la obtención en estéril de suspensiones celulares según lo descrito en el apartado 9, 10^8 - $1,5 \times 10^8$ células fueron incubadas con combinaciones de los AcMs conjugados a diferentes fluorocromos para diferenciar las poblaciones de interés. Se utilizaron AcMs anti-CD4-PerCP y anti-CD25-APC (Tabla1) para separar células T efectoras (CD4⁺CD25⁻) y células Treg (CD4⁺CD25⁺); y se añadió también un AcM anti-CD62L-FITC (Tabla1) para purificar células T-CD4+ *naïve* (CD4⁺CD25⁻CD62L^{high}). Después de una incubación de 30' a 4°C, se realizó un lavado con PBS-1%BSA para eliminar el exceso de Ac y se resuspendió el pellet en PBS a una concentración aproximada de 20×10^6 células/ml. Posteriormente, las poblaciones linfocitarias mencionadas anteriormente fueron separadas con una pureza superior al 98% con ayuda de un citómetro y separador celular FACSaria (Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) y recogidas en medio RPMI suplementado para evitar su muerte durante el proceso de purificación.

En el caso de las células Treg (CD4⁺CD25⁺), después de la purificación se comprobó su expresión de Foxp3. A pesar de ser el factor de transcripción específico de dicha población, Foxp3 no se puede utilizar para su separación ya que al ser intracelular, el marcaje conlleva la permeabilización y muerte celular. De cualquier modo, se comprobó que más del 97% de las células Tregs purificadas eran Foxp3⁺ en todas las líneas de ratones analizadas **Figura 6**.

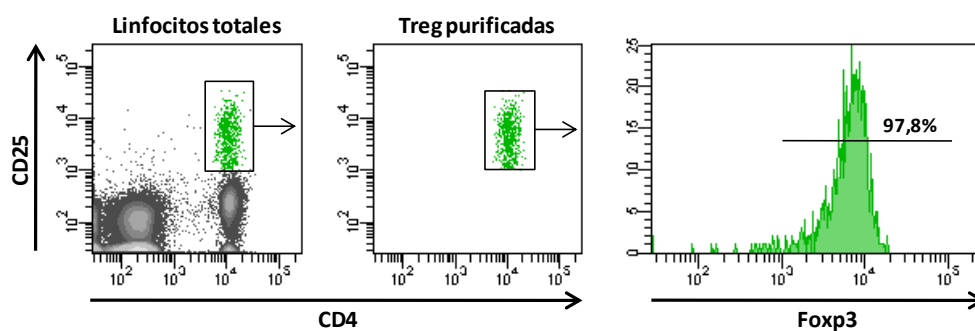


Figura 6. Expresión de Foxp3 en células Treg CD4⁺CD25⁺ purificadas. Tras la purificación de células Treg a partir de suspensiones celulares de bazo y ganglios linfáticos, se valoró mediante citometría de flujo la expresión de Foxp3. Las imágenes muestran la población de células CD4⁺CD25⁺ antes y después de la purificación. En el histograma se indica el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ después de la purificación.

Purificación de células presentadoras de antígeno (APCs)

Las APCs se obtuvieron a partir de suspensiones celulares de bazo de ratones B6 tras eliminación *in vitro* de los linfocitos T. Para ello, las suspensiones fueron incubadas durante 30' a 4°C con 100µl/10⁷ células de sobrenadante de cultivo del AcM AT-83 que reconoce la molécula Thy1.2 (CD90.2) presente en todos los linfocitos T. Tras lavados en PBS, las células fueron resuspendidas en medio c-kill en una proporción de 1 ml/20x10⁶ células e incubadas con complemento (*low Tox-M rabbit complement*, CEDARLANE) en relación 1:15 con el volumen de medio c-kill durante 30' a 37°C. La eficacia del tratamiento *in vitro* fue verificada mediante citometría de flujo.

13.- Cultivos celulares

Cultivos de diferenciación de linfocitos T-CD4⁺ naïve

Se partió de células T-CD4⁺ naïve (CD4⁺CD25⁻CD62L^{high}) purificadas en condiciones de esterilidad según el método descrito anteriormente y diluïdas posteriormente a una concentración de 5x10⁵ células/ml en medio RPMI suplementado. La siembra (5x10⁵ células/pocillo) se realizó en placas de 24 pocillos (Nunc) en donde se habían fijado a plástico AcMs IgG de hámster anti-CD3 murino (clon 145-2C11, Biolegend; 1 µg/pocillo) e IgG₂ de hámster anti-CD28 murino (clon 37.51, BD biosciences; 0,5 µg/pocillo) por incubación previa en PBS (250 µl/pocillo) durante 1-3h en estufa a 37°C. Las células se cultivaron durante 5 días en un incubador a 37°C y atmósfera controlada de 5% CO₂, en presencia de los siguientes estímulos:

Diferenciación a Th17

- TGFβ₁ humano (Peprotech): 0.5, 1 ng/ml
- IL-6 murina (Peprotech): 10, 50 ng/ml
- IgG_{2a} de rata anti IL-2 murina (clon JES6-1A12): 5 µg/ml

Diferenciación a iTreg

- TGFβ₁ humano (Peprotech): 0.5, 2 ng/ml
- IL-2 humana (Peprotech): 5 ng/ml

Diferenciación a Th1

- IL-2 humana (Peprotech): 1 ng/ml

- IFN γ (Peprotech): 5 ng/ml
- IgG1 de rata anti IL-4 murina (clon 11B11): 20ug/ml
- IL-12 (Peprotech): 20 ng/ml

La diferenciación de los linfocitos T-CD4⁺ *naïve* a células iTregs, Th17 y Th1 se cuantificó mediante citometría de flujo. Para valorar la diferenciación a células Th17 y Th1 se determinó la expresión intracelular de IL-17A e IFN γ respectivamente. Para ello, los linfocitos fueron estimulados durante las últimas 4 h de cultivo con 50 ng/ml de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*, Sigma) y 750 ng/ml de Ionomicina (*Ionomycin, free acid, S. Conglobatus*; Calbiochem), en presencia de 0,8 μ l/ml de brefeldina A (GolgiPlug, BD biosciences) durante las 2 últimas. Esta estimulación en presencia de Brefeldina A induce la producción y acúmulo intracelular de citocinas permitiendo de este modo su detección. A continuación las células se marcaron extracelularmente con AcM anti-CD4-PerCp e intracelularmente con AcMs mencionados anteriormente.

En la diferenciación a iTregs, se valoró la expresión intracelular de Foxp3, factor de transcripción específico de esta población. Para ello, las células se marcaron extracelularmente con AcM anti-CD4-PerCp y anti-CD25-APC, e intracelularmente con AcM anti-Foxp3-PE, siguiendo también el protocolo descrito anteriormente.

Cultivos de supresión con Tregs

En este caso se necesitaron tres tipos de poblaciones celulares purificadas: células T CD4⁺ efectoras (CD4⁺CD25⁻), células Treg (CD4⁺CD25⁺) y APCs. Tras su purificación se diluyeron en los tres casos a una concentración de 10⁶ células/ml en medio RPMI suplementado.

Los estudios consistieron en el cocultivo, en placas de 96 pocillos de fondo plano estériles (Nunclon™) y por triplicado, de 5x10⁴ células T efectoras con ratios crecientes de células Treg (seis condiciones, desde 1:0,06 a 1:2 T efectoras/Treg) en presencia de 0,5 μ g/ml de AcM anti-CD3 soluble (clon 145-2C11, Biolegend) y 5x10⁴ APCs purificadas. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C en una atmósfera controlada de 5% CO₂ durante 72 h, y las últimas 8 h de cultivo se añadió al medio 1 μ Ci/ml de timidina tritiada (*methyl-H³ Thymidine*, Amersham, GE Healthcare).

Para determinar la proliferación, se evaluó la incorporación de timidina tritiada. Al finalizar las 72 h de cultivo, las células fueron recogidas sobre un filtro especial

(Printed Filtermat A, 90x120 mm, PerkinElmer) con ayuda del equipo FilterMate Harvester (PerkinElmer), haciendo varios lavados para descartar la timidina no adquirida; y a continuación se empapó al mismo con líquido de centelleo (Optiphase superMix, PerkinElmer), y se determinó la emisión de radiación utilizando el equipo 1450 LSC & Luminiscence counter, MicroBeta TriLux, (PerkinElmer) que proporcionó los datos en cuentas por millón (c.p.m.), cuyo número fue proporcional a la proliferación celular en cada una de las condiciones.

Cultivos de inducción del receptor CD25

Purificamos linfocitos T-CD4⁺ de bazos WT y BAMBI^{-/-} con ayuda de un citómetro y separador celular FACSaria (Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA) y se recogieron en medio RPMI suplementado. La siembra (5×10^5 células/pocillo) se realizó en placas de 24 pocillos (Nunc) en donde se habían fijado a plástico AcMs anti-CD3 murino (1 µg/pocillo) y anti-CD28 murino (0,5 µg/pocillo) por incubación previa en PBS (250 µl/pocillo) durante 1-3h en estufa a 37°C. Cultivamos las células a distintos tiempos y en condiciones diferentes de TGFβ e IL-2 según se indica en los experimentos. Posteriormente valoramos la expresión extracelular de CD25 por citometría de flujo.

14.- Estudio de la expresión de citocinas y BAMBI por PCR cuantitativa

Extracción del RNA. Técnica del Trizol-Cloroformo

En el momento del sacrificio de los ratones, se extrajeron los distintos órganos y se congelaron para llevar a cabo estudios de RNA. Las patas congeladas se machacaron con ayuda de un mortero de porcelana (Fisher Scientific) y unos 200 mg de tejido se mezclaron con 1 ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen) dejando actuar 15' a RT, centrifugando después en frío a 13.000 rpm, 8'. Tras la centrifugación se recogió la fracción líquida y se añadieron 200 µl de Cloroformo (*Chloroform*, ≥99.8%, A.C.S. reagent; Sigma) por cada ml de TRIzol inicial, agitando vigorosamente y dejando actuar unos 2-3' a RT, tras los cuales se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 20' obteniéndose tres fases. Se recogió la fase superior, transparente, y se añadieron sobre ella 500 µl de Isopropanol (*2-Propanol*, for molecular biology, ≥99%; Sigma) por cada ml de TRIzol inicial con vórtex posterior para homogeneizar la mezcla. Se dejó actuar durante 10' a RT y se centrifugó a 13.000 rpm, 10' y 4°C obteniendo de esta forma un pellet blanquecino que contenía

el RNA puro. Tras descartar el sobrenadante se añadió sobre el pellet 1 ml de etanol frío al 75% en dH₂O centrifugando de nuevo a 8.000 rpm, 5' y 4°C. En este momento se eliminó completamente el etanol y el pellet fue resuspendido en 20-30 µl de H₂O DEPC, libre de RNAsas. Su concentración se determinó midiendo la densidad óptica a 230 nm con un espectrofotómetro (BioSpec-nano, Shimadzu Biotech).

Extracción del RNA de cultivos celulares

Para la extracción de RNA de cultivos celulares partimos de una cantidad mínima de 10⁷ linfocitos por condición, ya que observamos que partiendo de concentraciones inferiores la cantidad y calidad del RNA extraído era mínima. Una vez recogidas las células de la placa procedimos a romperlas pasándolas varias veces por una aguja de 20G. La extracción de RNA la realizamos siguiendo el protocolo recomendado en el kit de Quiagen "RNeasy Plus Mini kit".

Obtención del cDNA

El RNA se utilizó como molde para conversión en cDNA mediante retrotranscripción inversa utilizando el protocolo aconsejado para la enzima *SuperScript® II reverse transcriptase* (Invitrogen). Como se indicaba, el proceso se desarrolló en tres fases, alcanzando finalmente un volumen total de 20 µl por muestra. Inicialmente se mezclaron 5 µg de RNA, 2 µl de *Random primers* (Invitrogen) y 1 µl de dNTPs a 10 mM (Bioline), y se llevaron hasta un volumen de 12 µl con H₂O miliQ estéril. Este pool se calentó a 65°C durante 5' para favorecer el anillamiento de los *random primers* con el RNA. A continuación se añadieron, por muestra, 4 µl de *First-strand Buffer* 5X, 2 µl de DTT (ditiotreitól) y 1 µl de Inhibidor de RNAsas (*RNaseOUT Ribonuclease inhibitor*, Invitrogen), manteniéndolo a 25°C, 2'. Finalmente se añadió 1 µl de la enzima transcriptasa inversa (*SuperScript® II Reverse transcriptase*, Invitrogen) y esta mezcla completa fue amplificada en un termociclador (VERITI, Applied biosystems) con el siguiente protocolo: 25°C-10'; 42°C-50'; 70°C-15' y mantener a 10°C.

Desarrollo de la qPCR

A partir del cDNA obtenido se realizó un estudio de expresión de citocinas a nivel articular utilizando la técnica de la PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). Para llevar a cabo el análisis, se utilizaron sondas TaqMan específicas para diferentes citocinas (IL-1β, IL-6, IL-17A, IFNγ, TNFα, TGFβ) conjugadas al

fluorocromo FAM (Applied biosystems), y en todos los casos se amplificó simultáneamente el gen de la GAPDH, utilizando una sonda TaqMan específica (Eurogentec) conjugada al fluorocromo HEX. Independientemente de la citocina analizada, el protocolo a seguir fue similar y se desarrolló según el proceso descrito a continuación. Se utilizaron, por reacción, en un volumen final de 22 μ l: 1-2 μ l de cDNA (250-500 ng), 11 μ l de buffer (*Premix Ex Taq 2X*, TAKARA), 1,1 μ l de la sonda de la citocina a analizar (Sonda 20X, Applied Biosystems; ver Tabla 3) y 0,6 μ l de GAPDH (de un pool de cebadores a 7,5 μ M y sonda a 1,5 μ M; ver tabla 4) alcanzando los 22 μ l con H₂O miliQ estéril. A partir de este pool, se cargaron duplicados de 10 μ l en placas de 96 pocillos (*Thermo-Fast® 96 Semi-Skirted plates*, Thermo Scientific) que se cubrieron con una cubierta adhesiva transparente (*ABsolute QPCR Seal*, Thermo Scientific). Utilizando un equipo detector de fluorescencia para qPCR (MX3005P, Stratagene) se sometieron al siguiente protocolo de amplificación, estandarizado para sondas TaqMan: 2'-50°C; 10'-95°C y 40-45 ciclos (15"-95°C, 1'-60°C). Los resultados se analizaron utilizando el programa MxPro-3005P con el método del $\Delta\Delta C_t$, representando la expresión génica relativa de cada una de las citocinas, normalizada con la de GAPDH.

<i>Sondas</i>	<i>Ref. librería Sondas TaqMan Applied Biosystems</i>
IL-1 β	Mm00434228_m1
IL-6	Mm00446190_m1
IL-17	Mm00439619_m1
TNF α	Mm00443258_m1
IFN γ	Mm00801778_m1
TGF β 1	Mm00441724_m1
mBAMBI	Mm01238922_g1

Tabla 2. Referencias de las sondas utilizadas en nuestros estudios, tomadas de la librería de *Applied Biosystems*. Todas las citocinas fueron adquiridas en formato 20X (*primers* + sonda conjugada al fluorocromo FAM) y se diluyeron hasta 1X en el volumen de reacción.

<i>Gen</i>	<i>Sonda-YY</i>	<i>Cebadores</i>
GAPDH murina	5'-CGTGCCGCCTGGAGAAACCTGCC-3'	5'-CAACCTGGTCCTCAGTGTAGC-3' 5'-AATGTGTCCGTCGTGGATCTG-3'

Tabla 3. Secuencia de sonda y primers de la GAPDH murina. Los dos primers, junto con la sonda conjugada al fluorocromo HEX (Yakima wellow, YY), se diluyeron en un pool conjunto a concentraciones de 7,5 μ M cada uno de los cebadores y 1,5 μ M de sonda. Fueron sintetizados por Eurogentec.

15.- Reactivos

15.1.- Tampones

- *PBS-1X (PBS)*: Tampón fosfato salino al 1X, y pH 7,2. Contiene por litro de dH₂O: 0,8 g de NaCl (Panreac), 0,2 g de KCl (Panreac), 0,2 g de KH₂PO₄ (Panreac), 1,15 g de Na₂HPO₄ (Panreac).
- *PBS-10X*: 8 g de NaCl, 2 g de KCl, 2 g de KH₂PO₄, 11,5 g de Na₂HPO₄, por litro de dH₂O.
- *PBT*: PBS con 2% BSA y 0,05% Tween 20.
- *TBE 5X*. Para 1l: 54 g de Tris, 27,5 g de ácido bórico, 0,5M de EDTA pH 8, y enrasar con dH₂O.
- *Solución de lisis de Eritrocitos*: Es un tampón de Tris-NH₄Cl a pH 7,5. Está compuesto por un volumen de una solución de Trizma base y nueve volúmenes de Cloruro amónico disuelto al 0,83% (peso/volumen) en agua destilada. La primera solución contiene Tris-hidroximetil-aminometano (2,06 g en 100 ml de agua destilada, a pH 7,5).
- *Tampón T-TBS (Tween-Tris buffer salino)*. Para 1l: 20 ml de Tris HCl 1M pH 7,5, 37,5 ml de NaCl 4 M en agua destilada y 0,5 ml de Tween-20.
- *Tampón de Coating para colágeno*. Solución acuosa con Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 y NaCl 0,2 M.
- *Tampón Pre-PNT*. Para 1 l: 68,4 ml de una solución de Na₂HPO₄ 1 M, 31,66 ml de una solución NaH₂PO₄ 1 M, completando con agua destilada.
- *Tampón PNT para dilución de sueros y lavados en el ELISA de colágeno*. Para 500 ml: mezclar 50 ml de buffer Pre-PNT, 5,84 g NaCl (Panreac), 250 μ l de Tween-20 y 450 ml de dH₂O.
- *Tampón borato salino (BBS)*. Para 1l: 6,18 g de ácido bórico, 4,38 g NaCl, 9,54 g Bórax, completando hasta 1 l con dH₂O y llevando a pH 8,3-8,5.

- *Tampón sustrato para el ELISA convencional:* constituye el medio de reacción para la fosfatasa alcalina, y está compuesto por una disolución acuosa de 9,7% en volumen de dietanolamina (Panreac), 0,1 mg/ml de MgCl hexahidratado (Serva) y 0,2 mg/ml de azida sódica (Merk). El pH fue ajustado a 9,8 y el tampón fue conservado a oscuridad a temperatura ambiente. En el momento de uso se mezclaron 5 ml de este buffer con 5 mg de pNPP (*4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate*, Sigma).
- *Tampón Acetato-acético 60mM, pH 4.* Para 100 ml: mezclar 18 ml de acetato sódico 60 mM y 82 ml de ácido acético 60 mM.
- *Formol tamponado al 4%.* Para 1l: 100 ml de Formaldehído 37% (Scharlau), 900 ml de dH₂O, 6,5 g de Na₂HPO₄ (Panreac) y 4 g de NaH₂PO₄·H₂O (Merk). Llevar a pH 7-7,2.

15.2. Soluciones

- *PBS-BSA.* Es una disolución de albúmina sérica bovina (BSA, Serva) en PBS 1X. Las concentraciones se refieren al porcentaje peso/volumen.
- *PFA 2%:* Contiene 2 g de paraformaldehído (Serva) disueltos con calor (65° aprox.), hasta un volumen total de 100 ml, en 5 ml de PBS-10X, agua destilada y 3 µl de NaOH. Esta solución fue filtrada y conservada a 4°C o a temperatura ambiente.
- *Saponina 3%.* Para utilizarla como agente permeabilizante de membranas tisulares, se empleó Saponina al 0,03% en PBS. Esta disolución se preparó en el momento de uso, partiendo de un stock de saponina (Sigma) al 3% en PBS, conservado a 4°C un máximo de una semana.
- *Sulfato Amónico Saturado (SAS).* Disolución de 540 g de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄, Sigma) en 600 ml de dH₂O.
- *Solución de Timidina 10 µCi/ml.* Obtenida al diluir el stock de Timidina 1 mCi/ml (methyl-H³ Thymidine, Amersham, GE Healthcare) en medio RPMI-suplementado hasta esta concentración. Las alícuotas se conservan congeladas a -20°C hasta su uso.
- *Solución Decalcificadora.* Mezcla de volúmenes similares (1:1) de ácido fórmico al 8% y ácido clorhídrico al 8%.
- *H₂O DEPC.* Después de diluir 1 ml de DEPC (dietil pirocarbonato, SERVA) en 1 l de dH₂O, se incubó durante 24 h a 37°C y finalmente se esteriliza, conservándose después a 4°C.

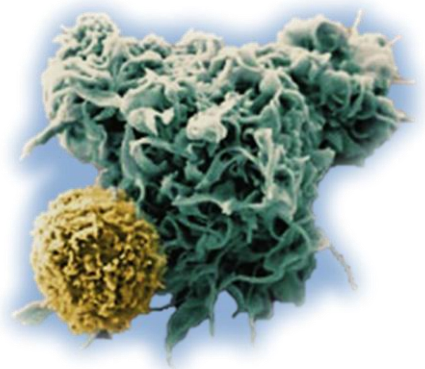
15.3. Medios de cultivo

- *Medio de cultivo Eagle de Dulbecco Modificado (DMEM, Gibco) suplementado.* Se suplementó el medio DMEM con Hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina-streptomomicina 10 µg/ml, β-mercaptoetanol 10 µM y 10% de suero fetal bovino (FBS) descomplementado por calor y filtrado. Todos estos últimos reactivos fueron comprados a Sigma, St. Louis, MO.
- *Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado.* Se suplementó el medio RPMI 1640 con Hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina-streptomomicina 10 µg/ml, β-mercaptoetanol 10 µM, piruvato sódico 1% (v/v) (Lonza) y 10% suero fetal bovino (FBS) descomplementado por calor y filtrado. Todos estos últimos reactivos fueron comprados a Sigma, St. Louis, MO.
- *Medio c-Kill.* Compuesto por medio RPMI 1640 suplementado con 0,3% BSA y Hepes 2 mM.

16.- Análisis Estadístico

En general, para comparar la severidad de CIA, la expresión de citocinas y los títulos de Ac anti-CII y anti-ssDNA, el grupo experimental fue comparado con el grupo control correspondiente mediante un test no paramétrico de *Mann Whitney*. Para comparar las variaciones en el porcentaje de diferentes poblaciones linfocitarias y en los cultivos de supresión, se utilizó la *t de Student*, aplicando la corrección de Welch en caso de haber diferencias significativas entre las varianzas. Las diferencias fueron consideradas no significativas cuando $p \geq 0,05$ (ns), significativas cuando $p < 0,05$ (*), muy significativas si $p < 0,01$ (**) y altamente significativas cuando $p < 0,001$ (***). Estos análisis se llevaron a cabo empleando el programa informático GraphPad Prism®4.0.

IV.RESULTADOS



IV. RESULTADOS

1.- EXPRESIÓN E INDUCCIÓN DE BAMBI EN LINFOCITOS T-CD4⁺

Para valorar el posible papel de BAMBI en los linfocitos T-CD4⁺, se analizó en primer lugar su expresión en el timo, en el bazo y tras la activación de los linfocitos T-CD4⁺ *in vitro* mediante RT-PCR cuantitativa. Como control negativo, analizamos la expresión de BAMBI en ratones deficientes en dicha proteína. La figura 1 muestra que BAMBI se expresa en el timo y bazo y que dicha expresión se incrementa en linfocitos T-CD4⁺ maduros, aunque sin alcanzar significación estadística, tras su activación *in vitro* con anticuerpos anti-cd3 y anti-cd28. Sin embargo, la adición de TGFβ al cultivo incrementa significativamente los niveles de mRNA de BAMBI en linfocitos T-CD4⁺ activados (**figura 1**). Por lo tanto, este estudio inicial sugiere un papel potencial de BAMBI durante el desarrollo y función de los linfocitos T-CD4⁺.

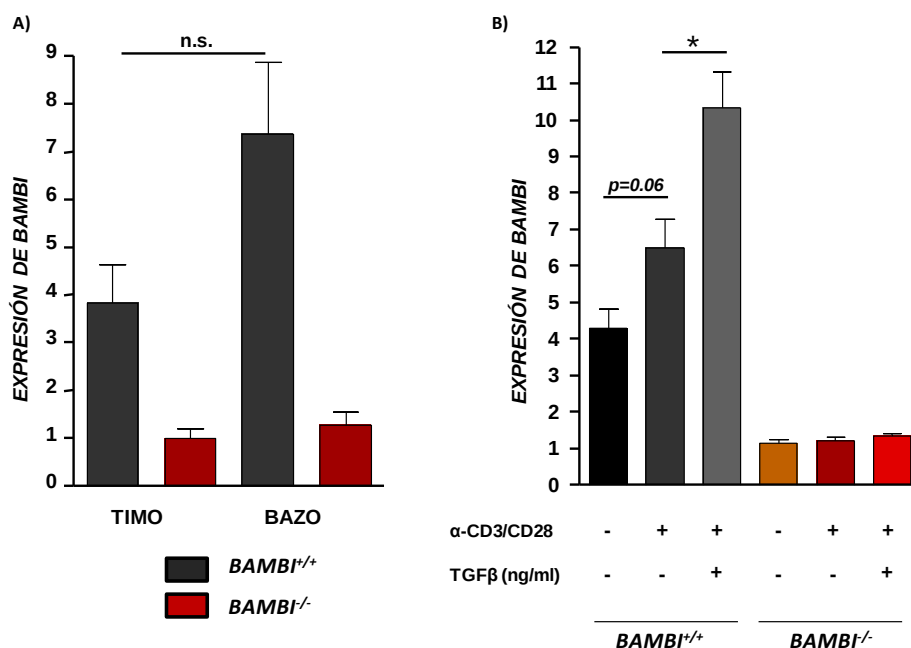


Figura 1. Expresión de mRNA de BAMBI extraído de ratones C57BL/6 BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-}. Amplificado mediante qPCR utilizando sondas Taqman. En la grafica se muestra la media ±SD de los niveles relativos de expresión de mRNA de BAMBI normalizado con respecto a la expresión del gen de la GAPDH. A) Expresión de BAMBI en órganos linfoides de ratones BAMBI^{+/+}. B) Expresión de BAMBI en linfocitos T-CD4⁺ tras 48 horas en cultivo. Estimulados con αCD3/αCD28 en presencia o ausencia de 2ng/ml de TGFβ. Como controles negativos para A y B se usaron ratones BAMBI^{-/-} (en rojo), que no expresan la proteína. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: ns (p ≥ 0.05; no significativo); * (p < 0.05).

2.- LOS RATONES DEFICIENTES EN BAMBI MUESTRAN UN AUMENTO EN LA SEÑALIZACIÓN POR TGF β EN LINFOCITOS T-CD4⁺

Para analizar en profundidad el papel de BAMBI en el sistema inmune se utilizó un ratón deficiente (knock-out) para esta proteína (ver materiales y métodos), descrito anteriormente por *Tramullas et al.*, 2010. Dado que BAMBI es un potente inhibidor de TGF β , se estudió si su deficiencia provocaba un incremento en la señalización por este factor de crecimiento en linfocitos T-CD4⁺. Para ello cuantificamos la fosforilación de SMAD3 tras estimulación de los linfocitos T-CD4⁺ con TGF β , gracias al uso de la tecnología *Alpha Screen SureFire* (ver materiales y métodos) que nos permite analizar la cantidad de Smad3 fosforilado ó activo (pSMAD3) mediante una señal luminiscente. TGF β induce la fosforilación de SMAD-3, de una manera dosis dependiente, en los linfocitos T de los ratones B6 (**figura 2**). Como cabría esperar, la deficiencia en BAMBI incrementa significativamente los niveles de pSMAD3 tras estimulación con TGF β , lo que indica que la señalización por esta citocina está incrementada en los ratones mutantes (**figura 2**).

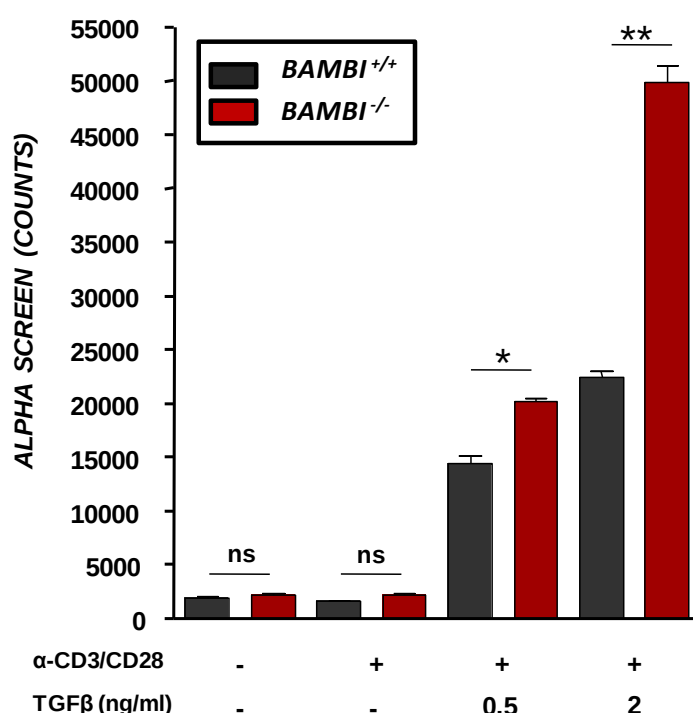


Figura 2. Niveles de pSMAD3 en linfocitos T-CD4⁺ de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} tras 24 horas en cultivo. Se sembraron 5x10⁵ células/pocillo en presencia o ausencia de distintas dosis de TGF β . Las unidades vienen representadas por Alpha Screen counts. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: ns (p $\geq$ 0.05; no significativo), * (p<0.05), ** (p<0.01).

3.- CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES LINFOIDES EN EL RATÓN BAMBI^{-/-}

Una vez establecido que BAMBI se expresa en los linfocitos T y que la señalización por TGF β se encuentra incrementada en los ratones deficientes en BAMBI, se analizó la presencia de alteraciones inmunológicas en estos ratones mutantes. Para ello, se caracterizaron fenotípicamente las distintas poblaciones linfoides en el timo y el bazo de los ratones BAMBI^{-/-} en comparación con los ratones silvestres controles (BAMBI^{+/+}), a distintas edades. Una reducción considerable del timo fue observada en los ratones BAMBI^{-/-} con respecto a los controles BAMBI^{+/+}; la celularidad del timo en los ratones mutantes se redujo en más de un 40% con respecto a la observada en los controles normales en todas las edades analizadas (**figura 3A**). La comparación de las diferentes subpoblaciones de timocitos entre ambos tipos de ratones muestra un aumento en el porcentaje de células simples positivas T-CD4⁺ y en menor medida de las T-CD8⁺ (solamente en los animales de 15 días de edad, acompañado de una reducción en la población de timocitos dobles positivos (DP) en los ratones BAMBI^{-/-} (**figura 3B**). Sin embargo, a pesar del incremento en el porcentaje de timocitos maduros, su producción total se ve reducida en los ratones BAMBI^{-/-} (**figura 3C**). Un incremento en el porcentaje de linfocitos T-CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ reguladores (Tregs), que compensa la reducción en el número total de timocitos, fue así mismo observado en los ratones BAMBI^{-/-} (**figura 3B y 3C**).

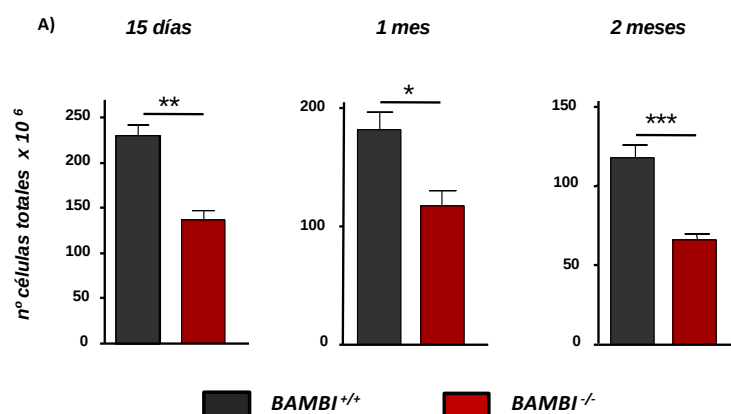


Figura 3A. Número de células totales del timo de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} a los 15 días, un mes y dos meses de edad. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

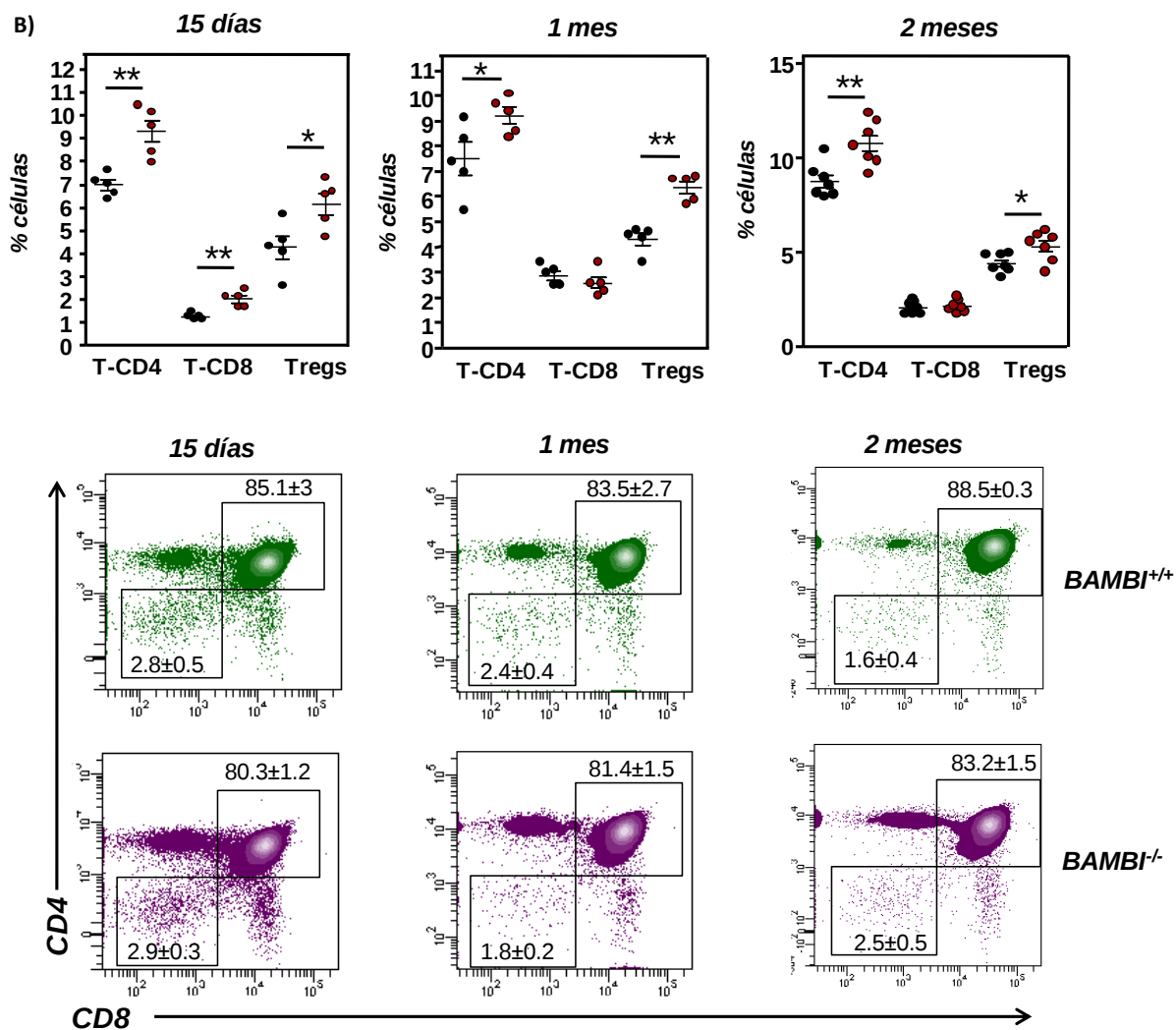


Figura 3B. Distribución de las poblaciones de linfocitos en el timo a los 15 días, 1 mes y 2 meses. Porcentajes de linfocitos T-CD4⁺, T-CD8⁺ y Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) de ratones BAMBI^{+/+} (gris) y BAMBI^{-/-} (rojo) e imágenes de la citometría de flujo realizada usando los AcM anti-CD4 y anti-CD8, donde se muestra la media±SD de las poblaciones DP y DN. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: * (p<0.05), ** (p<0.01).

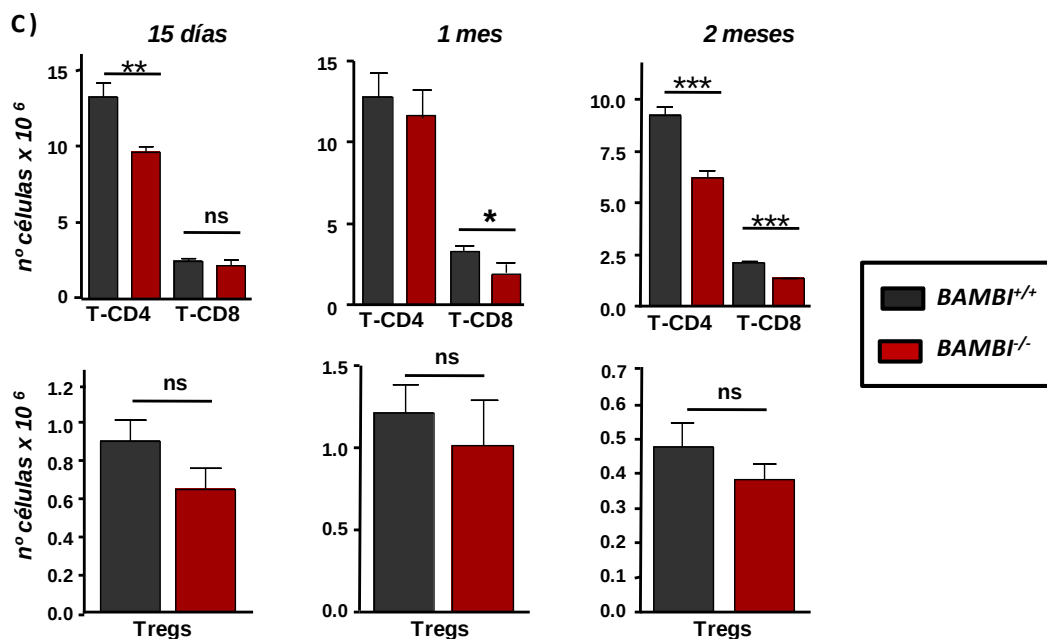


Figura 3C. Número de células totales de cada una de las poblaciones del timo a los 15 días, 1 mes y 2 meses. Calculadas extrapolando el porcentaje de cada una de las poblaciones al número total de células del órgano. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: ns ($p \geq 0.05$; no significativo), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

A pesar de la producción deficiente de timocitos maduros, no se encontraron cambios significativos en el bazo, tanto en tamaño como en celularidad, entre los ratones controles BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} en todas las edades analizadas (**Figura 4A**). El estudio de las diferentes poblaciones linfocitarias muestra que con la edad se produce un incremento en el número de linfocitos B y T-CD4⁺ acompañado de una reducción en el número de linfocitos T-CD8⁺, lo que provoca una desviación en el ratio de linfocitos T hacia la subpoblación T-CD4⁺ (**Figura 4B y C**). Con respecto a la población de linfocitos Tregs, no se observan cambios significativos en el bazo entre los ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} (**Figura 4C**).

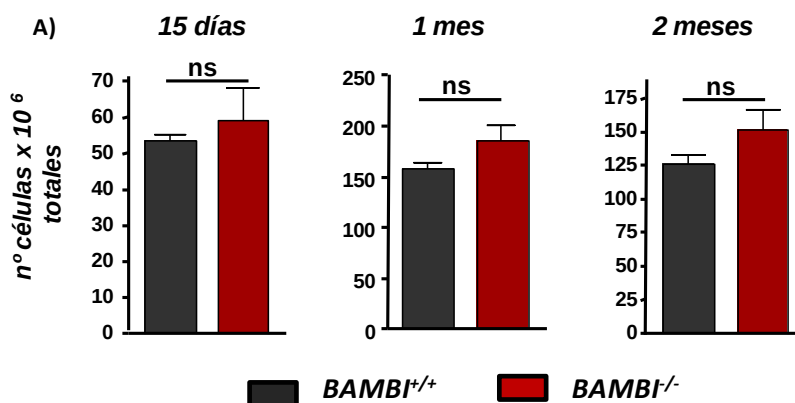
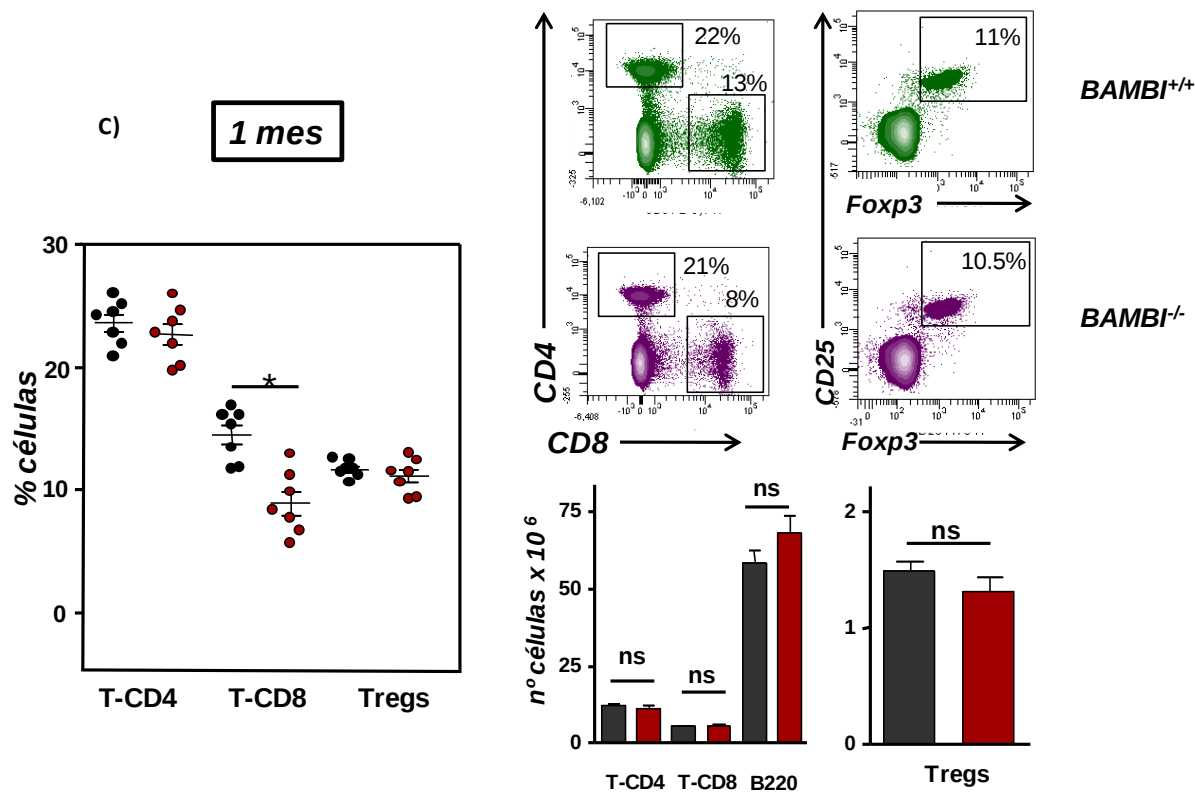
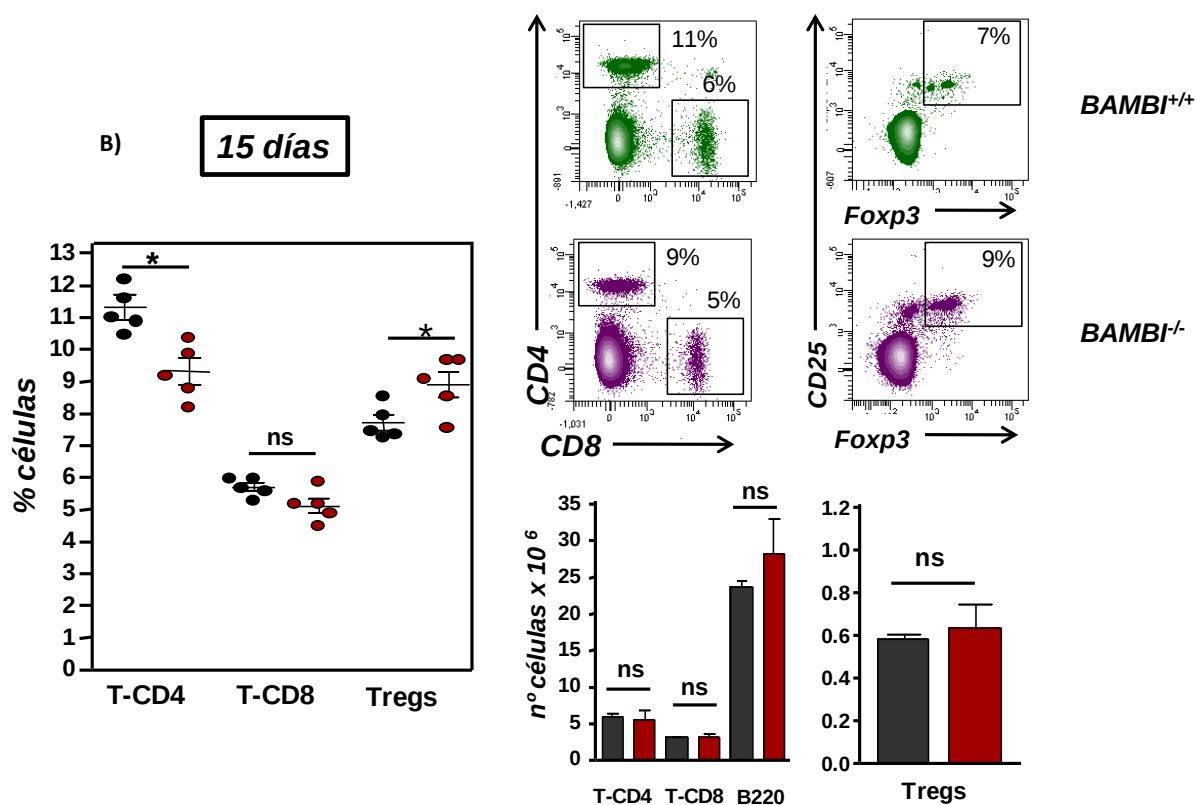


Figura 4A. Número de células totales del bazo de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} a los 15 días, 1 mes y 2 meses de edad. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: ns ($p \geq 0.05$; no significativo).



expresión de la molécula CD25 (la cadena α del receptor de la IL-2) en comparación con la observada en los linfocitos Tregs de los ratones BAMBI^{+/+} (**Figura 5B**).

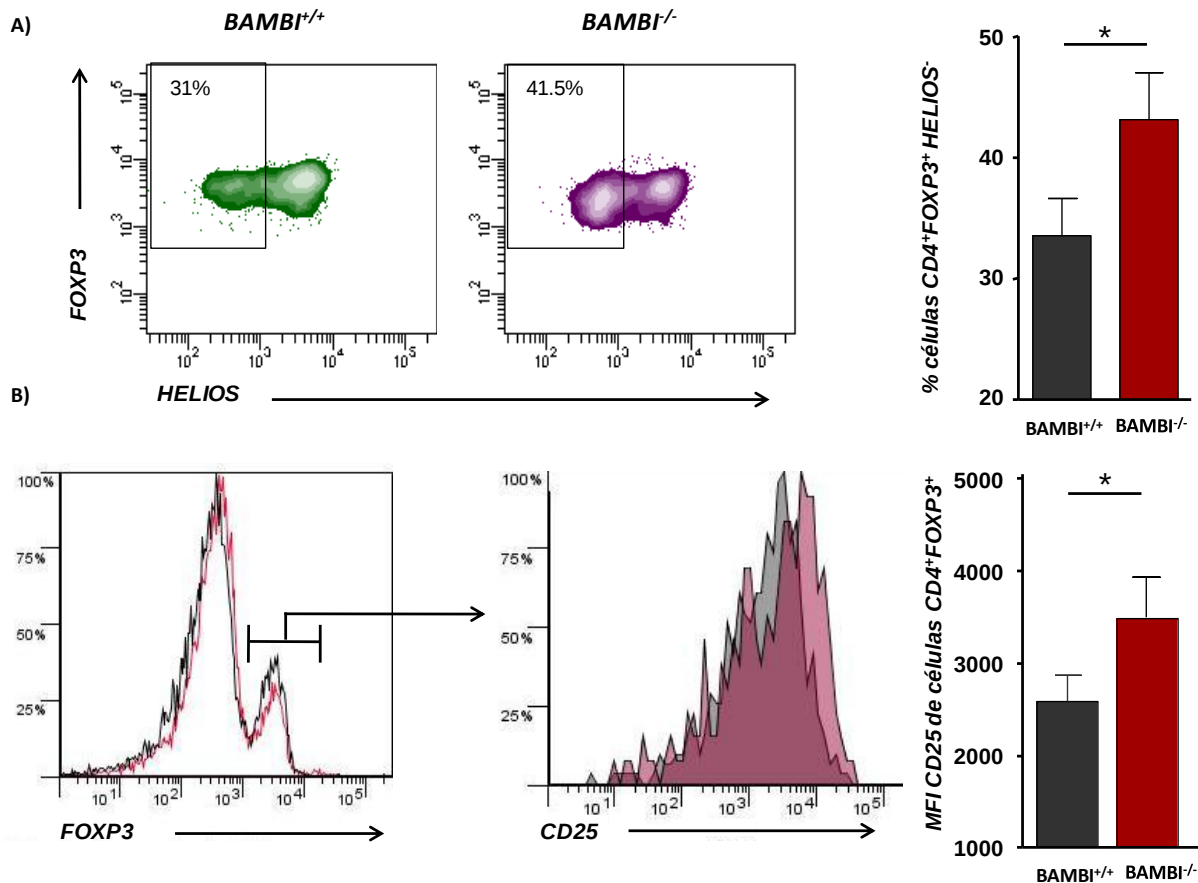


Figura 5. Distribución de la población de iTregs e intensidad de expresión de CD25 de las células Treg. (A) A la derecha, porcentaje de células iTreg (HELIOS⁺) dentro de la población Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) de ratones BAMBI^{+/+} (negro) y BAMBI^{-/-} (rojo). A la izquierda detalle de la citometría de flujo realizada con marcaje intracelular para los marcadores Foxp3 y Helios. (B) Intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD25 en la población de células Treg (CD4⁺FOXP3⁺). El histograma representa el *gate* realizado para seleccionar las células Foxp3⁺ y dentro de éstas analizar en el siguiente histograma el MFI de CD25. El histograma negro representa las células control BAMBI^{+/+} y el rojo las del BAMBI^{-/-}. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: * (p<0.05).

5.- INCREMENTO EN LA SEÑALIZACIÓN POR IL-2 EN LOS LINFOCITOS T-CD4⁺ y Tregs DE LOS RATONES BAMBI^{-/-}

Para comenzar a analizar los mecanismos responsables del incremento de expresión de CD25 en los linfocitos Tregs de los ratones BAMBI^{-/-}, se comparó la inducción de CD25, implicada en la señalización por IL-2, entre linfocitos T CD4⁺ de los ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} tras su activación *in vitro* con anticuerpos anti-CD3

y anti-CD28 en presencia o ausencia de IL-2 y TGF β . La molécula CD25 no se expresa en linfocitos T CD4⁺ *naïve* pero se induce rápida y transitoriamente tras la activación linfocitaria y dicha inducción es regulada positivamente y negativamente por la IL-2 y el TGF β , respectivamente (Chen *et al.*, 2003; Brabletz *et al.*, 1993). De acuerdo con esto, la mayoría de los linfocitos T-CD4⁺ de los ratones BAMBI^{+/+} expresan CD25 24 horas tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (**Figura 6**). La inducción de CD25 tras la estimulación fue significativamente mayor en los linfocitos T-CD4⁺ de los ratones BAMBI^{-/-}, analizando tanto el porcentaje de células positivas como la intensidad de expresión de CD25 en estas células (**Figura 6**).

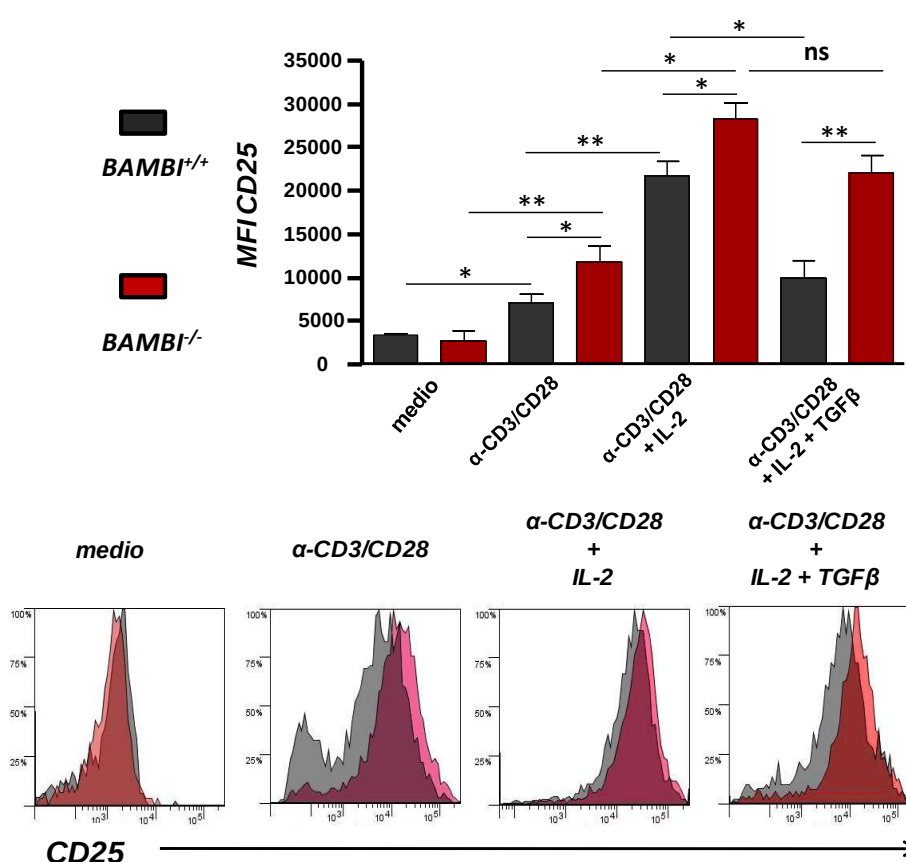


Figura 6. Intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD25 de linfocitos T-CD4⁺ purificados de bazo. Se cultivaron células con AcM anti-CD3/CD28 o bien con IL-2 ó con IL-2 + TGF β durante 24h. Derecha, gráfica de barras con la media $\pm$ SD. Barras negras representan el ratón BAMBI^{+/+} y las barras rojas el ratón BAMBI^{-/-}. Arriba detalle del histograma del MFI CD25 hecho sobre las T-CD4⁺, otra vez en negro representa las células control BAMBI^{+/+} y en rojo las del BAMBI^{-/-}. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: ns ($p \geq 0.05$; no significativo), * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

La adición al cultivo de IL-2 incrementó la expresión de CD25 en los linfocitos T CD4⁺ activados de los ratones BAMBI^{+/+}, mientras que la co-presencia de TGFβ inhibió dicho efecto inductor (**Figura 6**). De nuevo, el efecto inductor de CD25 de la IL-2 fue más marcado en los linfocitos T-CD4⁺ activados de los ratones BAMBI^{-/-}. Sin embargo, la capacidad de TGFβ de inhibir la expresión de CD25 inducida por IL-2 es mucho menor en los linfocitos T-CD4⁺ activados de los ratones BAMBI^{-/-} (**Figura 6**).

Los datos expuestos anteriormente apuntan a una alteración en los linfocitos T CD4⁺ de los ratones BAMBI^{-/-} que se manifiesta en parte por un incremento en la maquinaria de señalización de la IL-2 a través de la inducción de su receptor de alta afinidad. Esto parece ser especialmente cierto en el caso de los linfocitos Tregs de estos ratones, los cuales expresan constitutivamente niveles más elevados de CD25 que los de sus controles no transgénicos y en donde se observa una expansión en la/s población/es de iTregs y/o Tregs activadas que son Helios⁻. En este sentido, las células Tregs son particularmente dependientes de la IL-2 para su expansión y supervivencia en la periferia (D'Cruz and Klein 2005; Fontenot *et al.*, 2005). Para confirmar esta posibilidad, ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} fueron tratados con inmunocomplejos formados por la combinación de IL-2 y JES6-1 (un AcM anti-IL-2 murina) y el porcentaje de linfocitos Tregs fue analizado a diferentes días tras el tratamiento en el bazo y ganglios linfáticos mesentéricos. Otros autores han demostrado previamente que de este modo se incrementa la actividad biológica y la estabilidad de la IL-2 *in vivo*, y que este tratamiento induce una expansión selectiva de linfocitos T que expresan el receptor de alta, pero no de intermedia o baja, afinidad de la IL-2, conteniendo la molécula CD25 (especialmente la población de Tregs) (Boyman *et al.*, 2006). Nuestros resultados muestran un aumento en el porcentaje de Tregs significativamente mayor en los ratones BAMBI^{-/-} en comparación con los controles BAMBI^{+/+}, ya evidente a los 3 días en el bazo y a los 5 días también ya en los ganglios mesentéricos (**Figura 7**). Además volvemos a observar la expresión de CD25 en esta población es mayor en los ratones BAMBI^{-/-} que en los controles BAMBI^{+/+} (**Figura 7**). Estos resultados evidencian que la señalización por la IL-2 se encuentra incrementada en los linfocitos Tregs en ausencia de expresión de BAMBI.

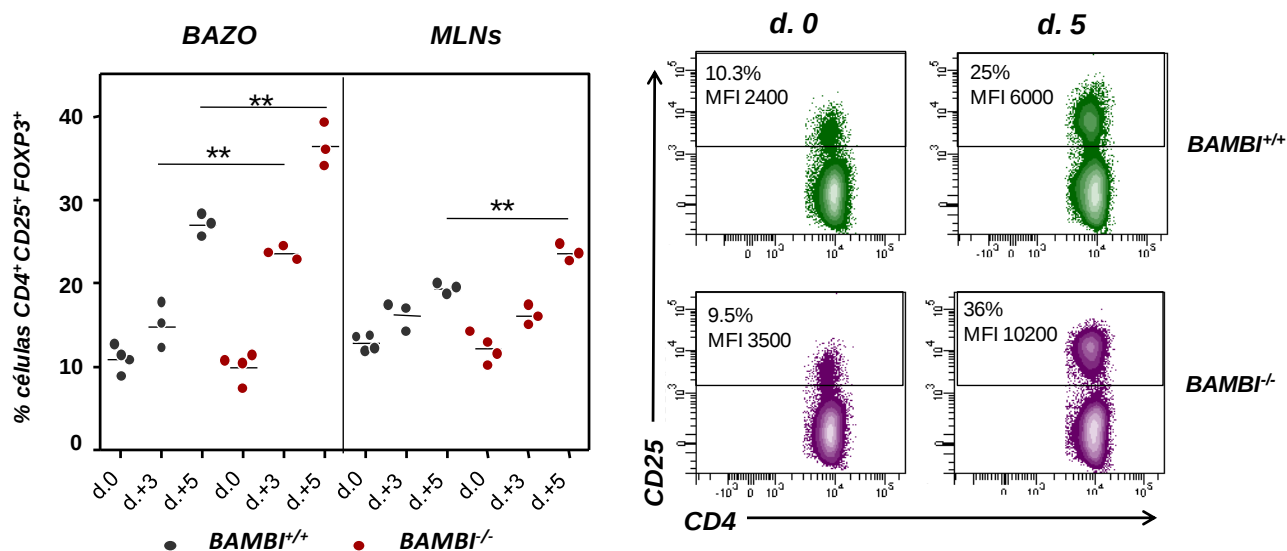


Figura 7. Frecuencia de las células Tregs en ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} antes y después del tratamiento con IL-2-anti-IL-2. A la izquierda, porcentaje de células Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) procedentes de Bazo y ganglios mesentericos (MLNs) a día 0, 3 y 5 después de la inyección intraperitoneal con 5ug del complejo IL2-anti-IL2. A la derecha, detalle de la citometría donde se muestra el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺ del bazo a día 0 y 5 tras la inyección, y el MFI de CD25. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: ** (p<0.01).

6.- AUMENTO EN LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LINFOCITOS Tregs EN LOS RATONES BAMBI^{-/-}

A la vista de los resultados descritos anteriormente, nos planteamos comparar la diferenciación *in vitro* de los linfocitos T-CD4⁺ *naïve* a células iTregs entre los ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-}. Para ello, células T-CD4⁺ *naïve* (CD4⁺CD25⁻CD62L^{high}) purificadas (más de un 99% de pureza) fueron estimuladas durante 5 días con AcM anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa en presencia de diferentes dosis de TGFβ1 recombinante. La diferenciación a linfocito Treg fue evaluada por citometría de flujo. Bajo estas condiciones de cultivo, una fracción significativa de las células T-CD4⁺ *naïve* del ratón BAMBI^{+/+} se diferenció a células Treg en una forma concentración-dependiente de TGFβ. Sin embargo, la inducción *in vitro* a Treg fue superior en el caso del ratón BAMBI^{-/-} alcanzando significación estadística con una concentración de 2 ng/ml de TGFβ (**Figura 8**).

La adición de IL-2 a las condiciones de diferenciación descritas anteriormente, incrementó enormemente la generación *in vitro* de linfocitos Tregs a partir de células T-CD4⁺ *naïve* del ratón BAMBI^{+/+}, alcanzandose porcentajes próximos al 100% con altas dosis de TGFβ (**Figura 8**). Sin embargo, en presencia de IL-2 desaparecieron

las diferencias observadas anteriormente entre ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} en dicha capacidad de los linfocitos T-CD4⁺ *naïve* a diferenciarse a Tregs (**Figura 8**).

En vista del efecto potenciador de la IL-2 en la diferenciación *in vitro* a linfocitos Treg mostrado anteriormente, analizamos posteriormente la importancia en dicha diferenciación a Treg de la IL-2 producida por los propios linfocitos CD4⁺ tras su estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de dosis crecientes de TGFβ1 recombinante. El bloqueo de la IL-2 endógena, con AcM anti-IL-2, suprimió casi por completo la diferenciación a Treg en el caso de los linfocitos T-CD4⁺ del ratón BAMBI^{+/+} mientras que esta inhibición fue mucho menos importante con los linfocitos T-CD4⁺ del ratón BAMBI^{-/-}, observándose una inhibición casi completa solamente con dosis bajas de TGFβ (**Figura 8**). Por último, cabe destacar que la adición al medio de cultivo de IL-6 (transformación a condiciones de diferenciación Th17) bloqueó completamente la diferenciación de las T-CD4⁺ *naïve* a linfocitos Treg en ambos tipos de ratones (**Figura 8**).

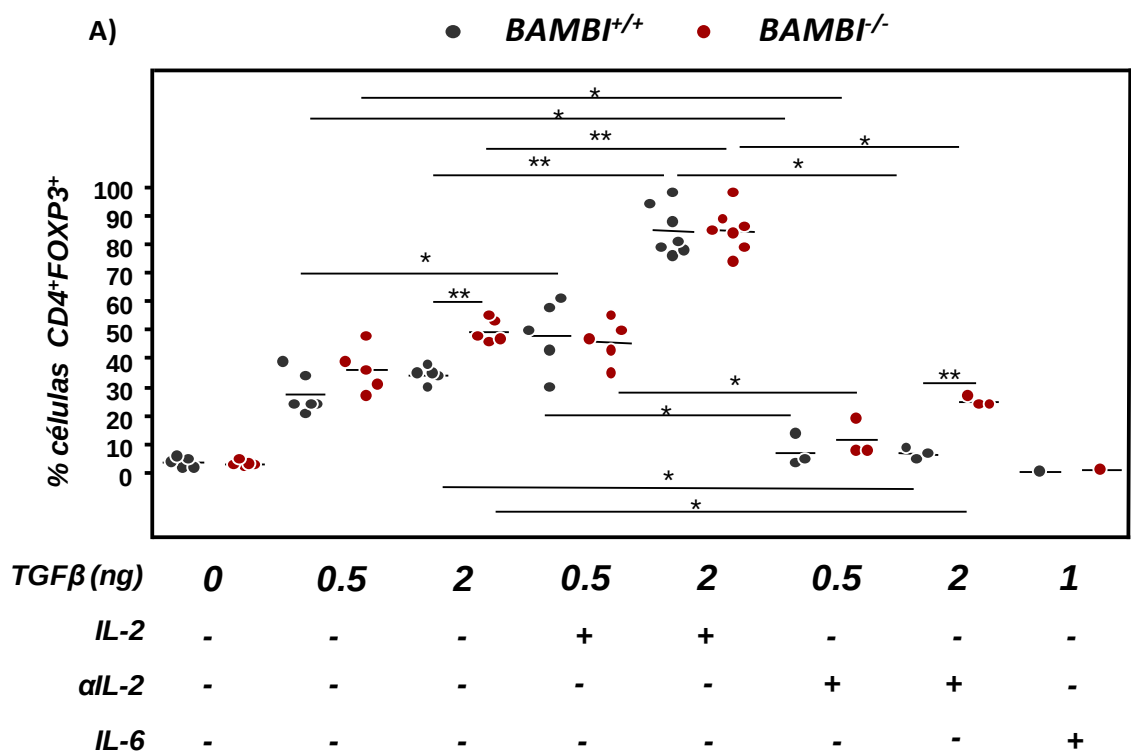


Figura 8. Diferenciación de las células T-CD4⁺ *naïve* a iTregs. Se cultivaron 5x10⁵ células T-CD4⁺ *naïve* de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} con AcM anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa (1ug/ml y 0.5ug/ml respectivamente). Se cultivaron 5 días y se marcaron con AcM anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3. Se cultivaron en presencia de dosis crecientes de TGFβ, en presencia o ausencia de 5ng/ml de IL-2, 10ng/ml IL-6 ó con 5ug/ml de anti-IL-2. **A)** Gráfica de puntos de experimentos independientes (en negro representa células del BAMBI^{+/+} y en rojo las del BAMBI^{-/-}). Los números indican el porcentaje de células CD4+CD25+Foxp3+. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: *(p<0.05), **(p<0.01).

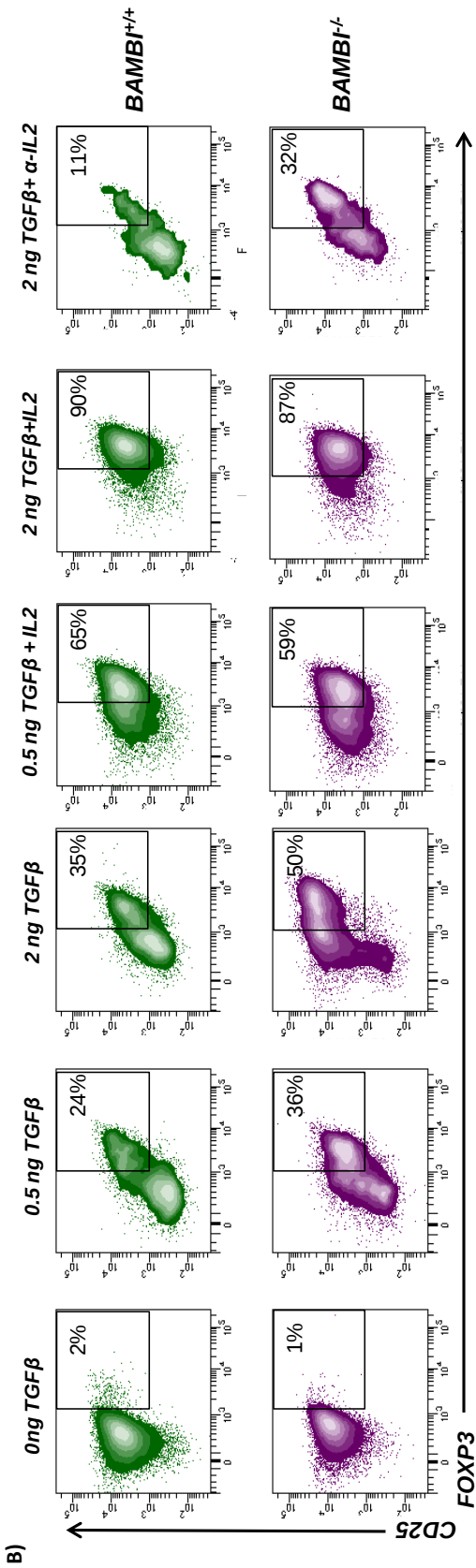


Figura 8. Diferenciación de las células T-CD4⁺ naïve a iTregs. Se cultivaron 5x10⁵ células T-CD4⁺ naïve de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} con AcM anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa (1ug/ml y 0.5ug/ml respectivamente). Se cultivaron 5 días y se marcaron con AcM anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3. Se cultivaron en presencia de dosis crecientes de TGFβ, en presencia o ausencia de 5ng/ml de IL-2 ó con 5ug/ml de anti-IL-2. **B)** Detalle de la citometria de CD25 y Foxp3 realizado sobre células CD4⁺.

7.- AUMENTO DE LA CAPACIDAD SUPRESORA DE LAS CÉLULAS Tregs DE LOS RATONES BAMBI^{-/-}

En vista de las diferencias fenotípicas observadas entre los linfocitos Tregs de los ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-}, comparamos su capacidad supresora *in vitro*. Las células Tregs se caracterizan por suprimir la respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ efectoras (CD4⁺CD25⁻) *in vitro* en cocultivos tras estimulación con un AcM anti-CD3 en presencia de APCs. Dicha inhibición es dependiente del ratio linfocito T-CD4⁺ efector/linfocito Treg presente en el cocultivo. Utilizando este sistema *in vitro*, se observó que las células Tregs del ratón BAMBI^{-/-} presentaron una capacidad supresora ligera pero significativamente superior a las de los ratones controles BAMBI^{+/+} (un incremento en la capacidad supresora de aproximadamente 2 veces) (Figura 9).

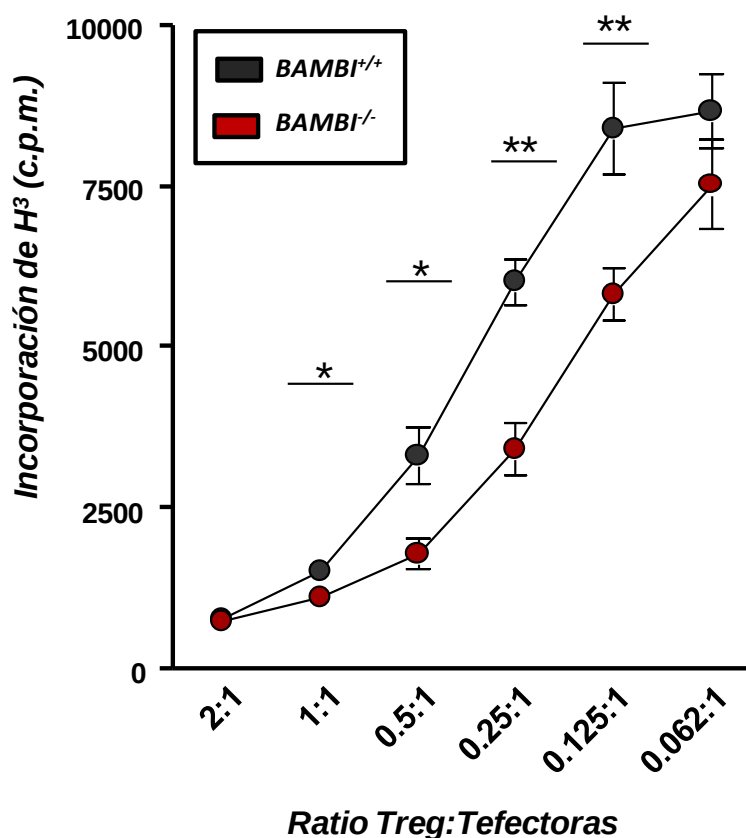
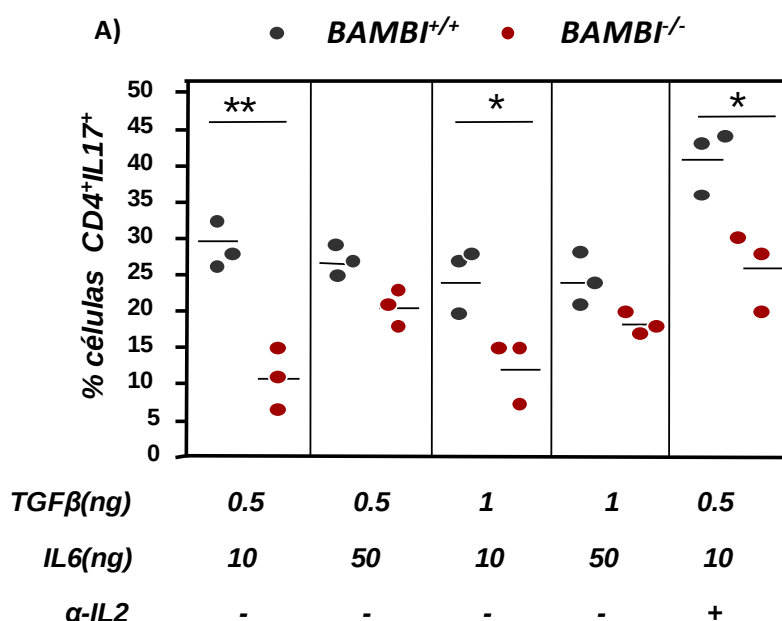


Figura 9. Cultivo de supresión de células Treg BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} sobre células efectoras de un ratón WT. Se cocultivaron 5×10^4 células T-CD4⁺ efectoras purificadas de un ratón WT estimuladas con anti-CD3 y APCs, con concentraciones decrecientes de células Treg de ratones deficientes (color rojo) ó no (color negro) en BAMBI y se determinó la proliferación a las 72h por incorporación de timidina tritiada. En la grafica se muestra la media ± SD de la proliferación en cada punto, expresada en c.p.m. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: * (p < 0.05), ** (p < 0.01).

8.- EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN BAMBI SOBRE LA DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* A LOS SUBTIPOS Th17 Y Th1

Con la finalidad de continuar con la caracterización funcional de BAMBI en linfocitos T-CD4⁺, estudiamos también la capacidad de los linfocitos T CD4⁺ *naïve* de estos ratones para diferenciarse a los subtipos funcionales pro-inflamatorios Th17 y Th1, en comparación con lo observado en la misma población linfocitaria de los ratones BAMBI^{+/+} controles. Células T-CD4⁺ *naïve* purificadas de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} fueron estimuladas durante 5 días con AcM anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa en presencia de TGFβ1, IL-6 y anti-IL-2 (condiciones Th17) o con IFNγ, IL-12 y anti-IL-4 (condiciones Th1). Posteriormente se calculó mediante citometría de flujo el porcentaje de diferenciación determinando la expresión de IL-17A para los linfocitos Th17 y de IFNγ para los linfocitos Th1. En condiciones estándar de diferenciación Th17 (con concentraciones de 10 ng/ml de IL-6), mientras que un porcentaje elevado de células T-CD4⁺ *naïve* de los ratones BAMBI^{+/+} se diferenciaron a linfocitos Th17, la diferenciación hacia este subtipo funcional fue significativamente menor en el caso de los linfocitos T-CD4⁺ procedentes de los ratones BAMBI^{-/-} (**Figura 10**). Estas diferencias se mantuvieron incluso con la presencia en el cultivo de anti-IL-2. Sin embargo, el incremento en la concentración de IL-6 en el cultivo se acompañó de un aumento en la diferenciación Th17 en los linfocitos T-CD4⁺ de los ratones BAMBI^{-/-} (asociado a la pérdida de la significación estadística), aunque ésta no alcanzó el mismo nivel que el observado los linfocitos T-CD4⁺ de los ratones BAMBI^{+/+} (**Figura 10**).



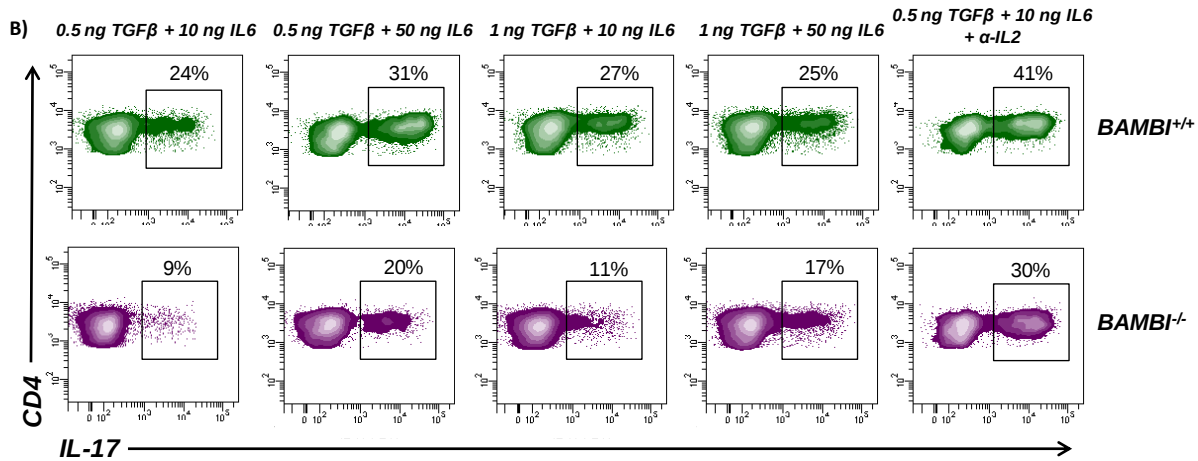


Figura 10. Diferenciación *in vitro* de células T-CD4⁺ naive a Th17. Se cultivaron 5×10^5 células T-CD4⁺ naive de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} con AcM anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa (1ug/ml y 0.5ug/ml respectivamente). Se cultivaron 5 días en presencia de distintas dosis de TGFβ, IL-6 y anti-IL-2 y tras un pulso durante 4h con PMA, ionomicina y Brefeldina, se marcaron con AcM anti-CD4, anti-IL-17. **A)** Grafica de puntos que representas experimentos independientes (color negro células de ratones BAMBI^{+/+} y color rojo células de ratones BAMBI^{-/-}). **B)** Detalle de la citometria realizada en CD4 y IL-17. Los números indican el porcentaje de células CD4⁺IL-17⁺. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Student se indican como: *(p<0.05), **(p<0.01).

Al analizar la frecuencia de células T-CD4⁺ diferenciadas al subtipo Th1, no observamos cambios estadísticamente significativos entre los linfocitos procedentes de los ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-}, aunque sí un ligero pero constante aumento en estos últimos (**Figura 11**).

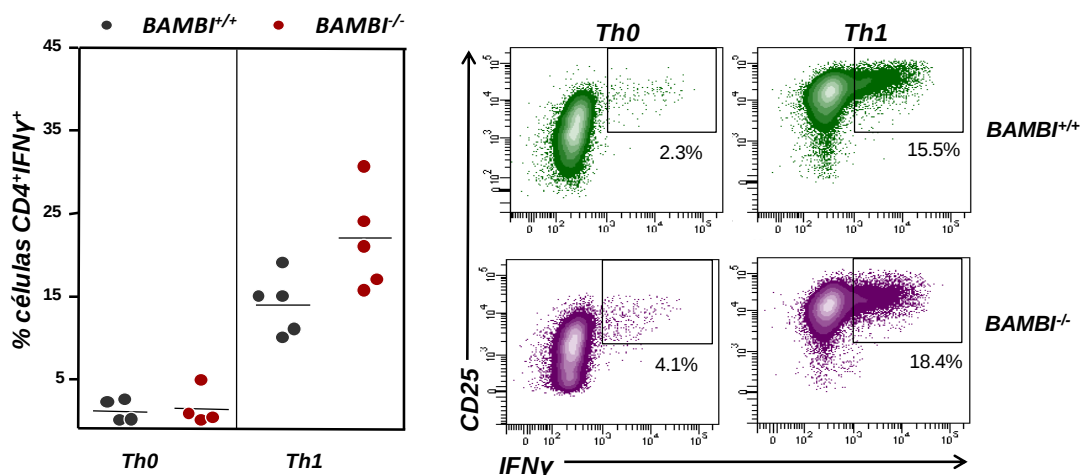


Figura 11. Diferenciación *in vitro* de células T-CD4⁺ naive a Th1. Se cultivaron 5×10^5 células T-CD4⁺ naive de ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} con AcM anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa (1ug/ml y 0.5ug/ml respectivamente). Se cultivaron 5 días en presencia de IL-12, IFNγ y anti-IL-4 y tras un pulso durante 4h con PMA, ionomicina y Brefeldina, se marcaron con AcM anti-CD4, anti-CD25 y anti-IFNγ. A la izquierda: gráfica de puntos que representa experimentos independientes. A la derecha: detalle de la citometria realizada sobre linfocitos T-CD4⁺. Los números indican el porcentaje de células CD4⁺IFNγ⁺.

9.- LA DEFICIENCIA EN BAMBI INHIBE EL DESARROLLO DE ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO (CIA)

La inmunización con colágeno de tipo II bovino (CII) en ratones de estirpes susceptibles H-2^a ó H-2^r (como los B10RIII) induce una artritis erosiva, con tendencia a la anquilosis, que se asemeja en gran medida a la artritis reumatoide en los seres humanos. Para valorar el efecto de la deficiencia en BAMBI sobre el desarrollo de CIA, retrocruzamos los ratones B6-BAMBI^{-/-} con ratones B10RIII hasta obtener animales con genotipos H-2^r-BAMBI^{+/+} y H-2^r-BAMBI^{-/-}. Los machos de 8 semanas fueron inmunizados con CII emulsionado en CFA y el desarrollo de CIA fue evaluado en las semanas sucesivas. Como cabría esperar, aproximadamente el 70 % de los ratones B10RIII-BAMBI^{+/+} desarrollaron una artritis severa desde el punto de vista clínico (**Figura 12A**), radiológico (**Figura 12B y 12C**) y anatomopatológico (**Figura 12D**). Dicha artritis se caracterizaba por la presencia de edema de partes blandas, hipertrofia ósea, erosiones del hueso subcondral y pérdida del espacio articular y afectación severa del cartilago articular. También se observó una disminución en la densidad ósea, principalmente en las áreas subarticulares de las epífisis, la aparición de sobrecrecimientos óseos periarticulares, proliferación del tejido sinovial hacia la cavidad articular (pannus) y signos de anquilosis fibrosa. (**Figura 12C y 12D**).

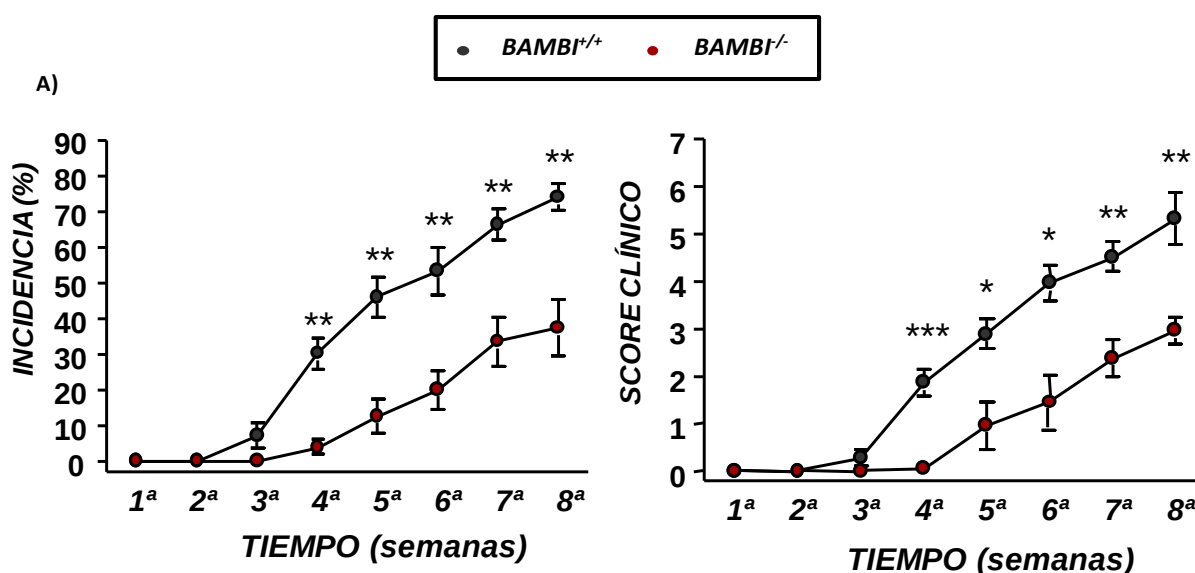


Figura 12A. Porcentaje de incidencia y score clínico de severidad durante las 8 semanas tras la inducción de CIA en ratones BAMBI^{+/+} (color negro) y BAMBI^{-/-} (color rojo). Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Mann Whitney se indican como: * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001).

Por el contrario, tanto la incidencia como la severidad de la CIA fue significativamente menor en los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-} (**Figura 12A-D**) evidenciándose solo un edema de partes blandas con muy discreta hipertrofia ósea y mínimas erosiones yuxtaarticulares y osteopenia sin afectación histológica del cartílago articular.

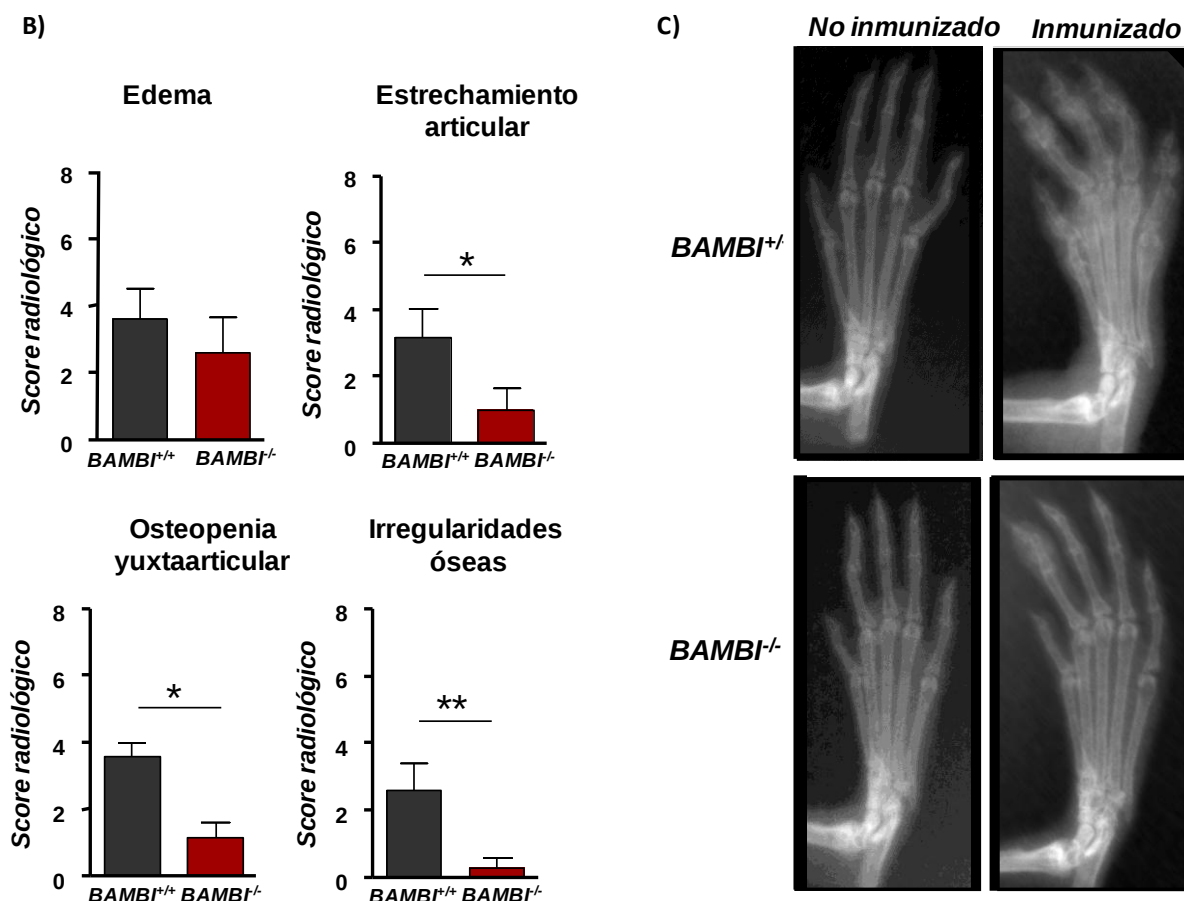


Figura 12B y C. Lesiones radiológicas a las 8 semanas tras la inducción de CIA. B) Gradación de los 4 parámetros principales que indican presencia de lesiones a nivel articular. Las graficas representan la media $\pm$ SD de la suma de los scores de las 4 extremidades. C) Imágenes radiológicas del tarso y las falanges tomadas a las 8 semanas tras inducción de CIA en ambos grupos de ratones. Se muestran imágenes representativas de las patas traseras. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Mann Whitney se indican como: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

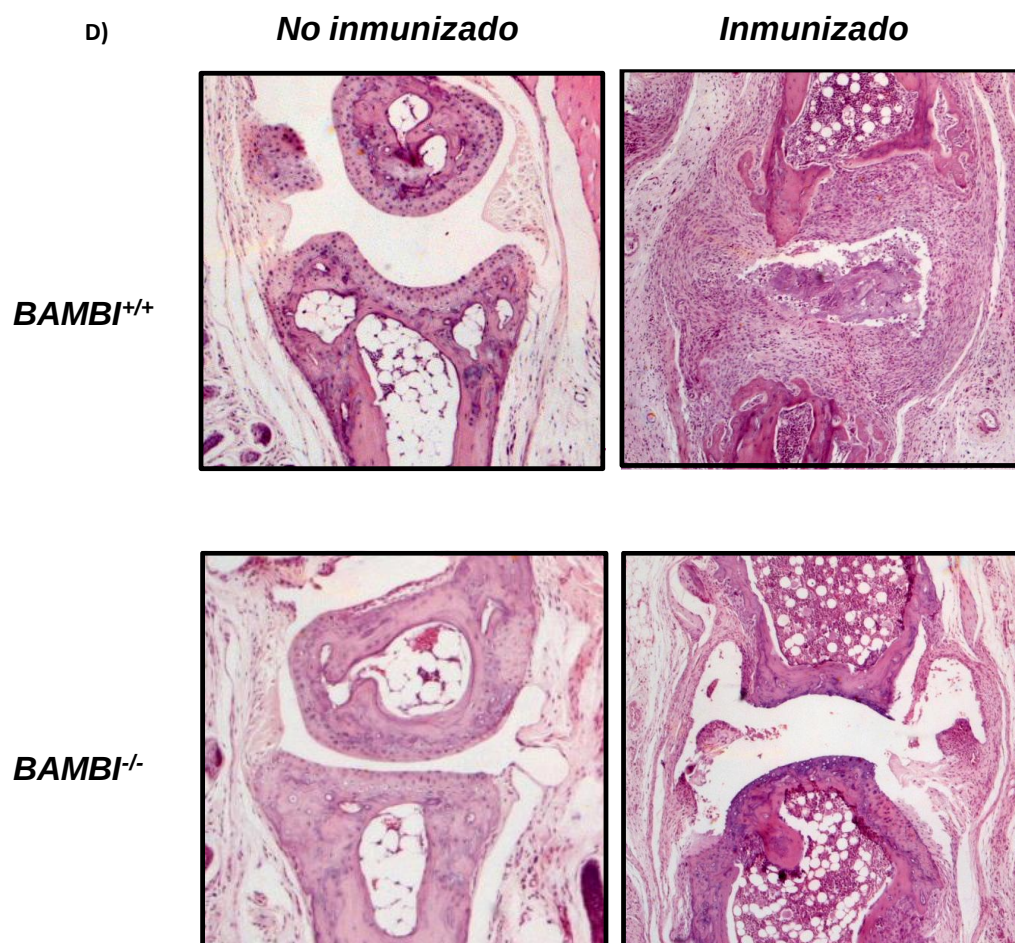


Figura 12D. Imágenes histológicas representativas de la CIA. Imágenes tomadas en patas de ratones de ambos grupos antes y 8 semanas después de la inmunización. Imágenes tomadas con el objetivo 10x, de cortes histológicos teñidos con H&E.

Para comenzar a analizar los mecanismos responsables de la protección contra el desarrollo de CIA en los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-}, en primer lugar se determinó en ambas cepas de animales los títulos de anticuerpos anti-CII circulantes tras inmunización con el antígeno, valorándose los isotipos IgG e IgA y los isotipos IgG1 e IgG2a anti-CII mediante ELISA. Los niveles circulantes de IgG total anti-CII fueron prácticamente idénticos en ambos grupos tras la inmunización (**Figura 13**). Sin embargo, observamos un desbalance en esta respuesta humoral IgG entre los ratones B10RIII-BAMBI^{+/+} y B10RIII-BAMBI^{-/-}. Así los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-} presentaron niveles reducidos de IgG2a, pero no de IgG1, anti-CII en comparación con los ratones B10RIII-BAMBI^{+/+} (**Figura 13**). Por el contrario y en relación con el aumento en la señalización linfocitaria por TGFβ, los niveles circulantes de IgA anti-CII fueron significativamente mayores en los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-} que en los B10RIII-BAMBI^{+/+} (**Figura 13**).

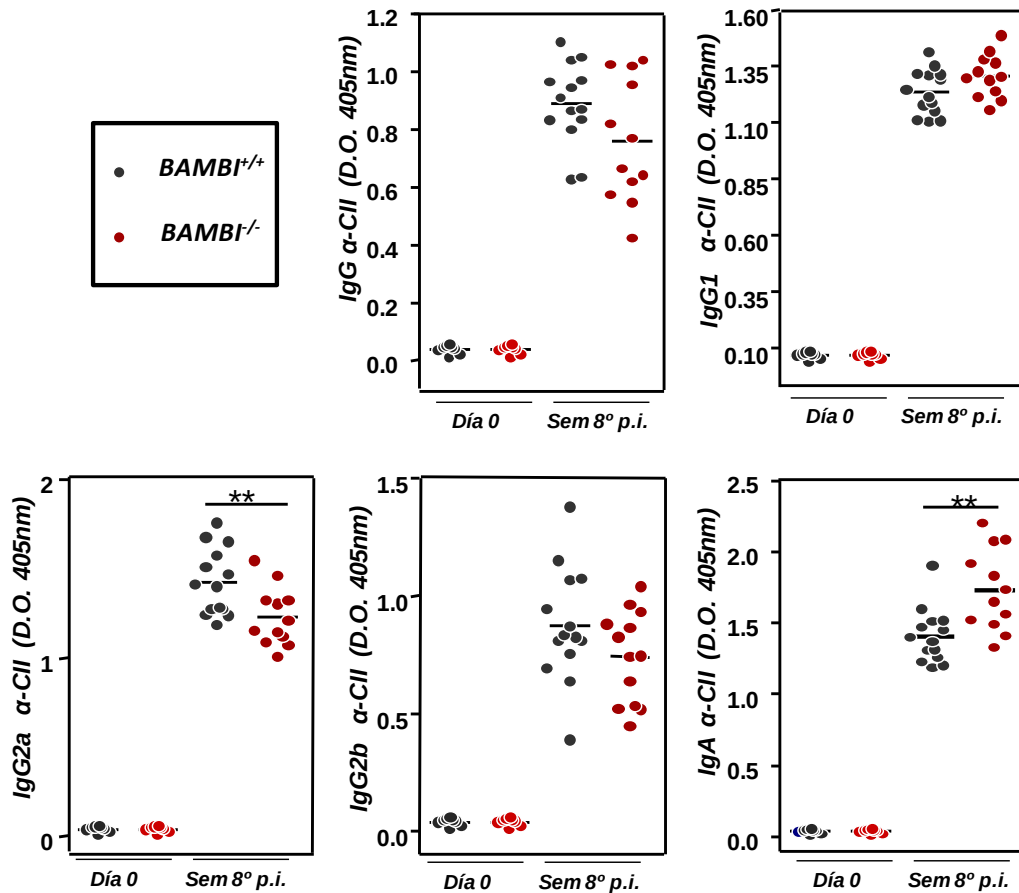


Figura 13. Niveles séricos de Ac anti-CII durante el desarrollo de CIA. En la figura se muestran los niveles de IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgA anti-CC de ratones BAMBI^{+/+} (color negro) y BAMBI^{-/-} (color rojo) a día 0 y semana 8ª p.i., valorados en suero mediante ELISA. Los valores se han expresado en unidades de densidad óptica (DO) medida a 405nm. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Mann Whitney se indican como: ** (p<0.01).

Dado que el fenotipo, la actividad y la diferenciación funcional de las células Tregs se encuentra alterada en los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-}, y al papel de esta población linfocitaria en el control de las enfermedades autoinmunes, analizamos el porcentaje de estas células en el bazo y en los ganglios linfáticos regionales (axilares e inguinales) antes y 13 y 21 días después de la inmunización con CII. Los resultados muestran un aumento en el porcentaje de las células Tregs tanto en el bazo como en los ganglios linfáticos en las primeras 2 semanas tras la inmunización en el ratón B10RIII-BAMBI^{-/-} que no se produce en el ratón B10RIII-BAMBI^{+/+} (**Figura 14**). Posteriormente (3ª semana tras inmunización), la frecuencia de estas células se iguala en ambas cepas de animales (**Figura 14**). Estos resultados indican que en el ratón B10RIII-BAMBI^{-/-} se produce una expansión precoz en la población de Tregs que no se da en el ratón B10RIII-BAMBI^{+/+}, pudiendo ser este uno de los posibles mecanismos responsable en la protección contra el desarrollo de la enfermedad observada en estos animales.

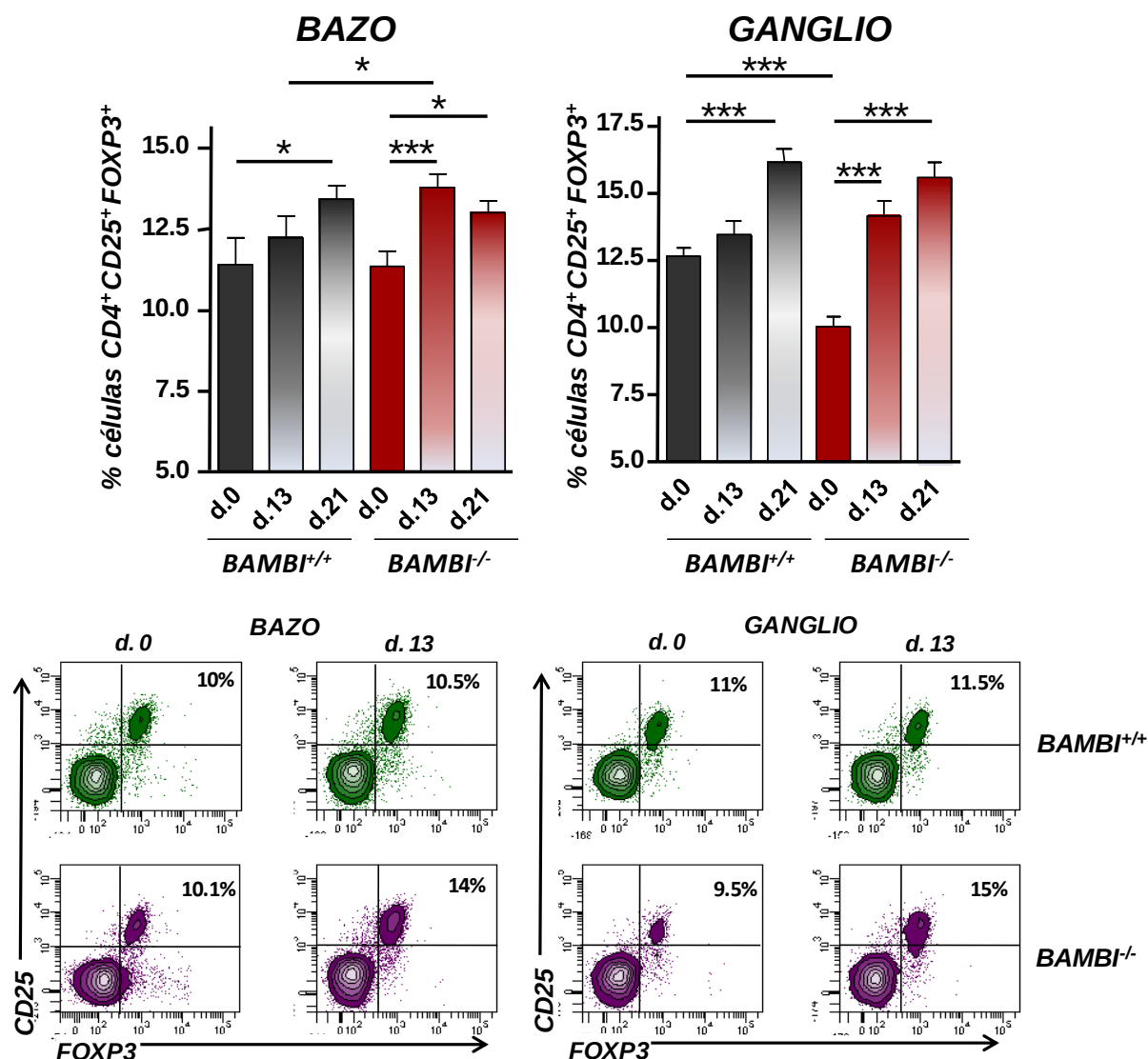


Figura 14. Porcentaje de las poblaciones de Tregs en controles no inmunizados e inmunizados con CII a día 13 y 21 en bazo y ganglios. Arriba, grafica de barras con la media $\pm$ SD del porcentaje de células Tregs en los distintos órganos a distintos tiempos. Abajo detalle de la citometría de flujo con AcM para CD25 y Foxp3 a día 0 y día 13 post-inmunización. Los valores que se muestran indican el porcentaje dentro de los linfocitos T-CD4⁺. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de Mann Whitney se indican como: *($p < 0.05$), ***($p < 0.001$).

Múltiples estudios han demostrado que las poblaciones celulares Th17 y Th1 juegan un papel muy importante en el desarrollo de patologías autoinmunes y más concretamente en la artritis reumatoide (Fujimoto *et al.*, 2008; Lubberts, 2010). En base a ello se comparó, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células productoras de IL-17A e IFN γ durante el desarrollo de CIA entre ambos grupos de animales. Al analizar las células Th17, se evaluó la fracción de estas que también producían IL-22, ya que se ha descrito que las células productoras de IL-17A e IL-22 son más pro-inflamatorias y median los procesos patogénicos *in vivo* (Geboes *et al.*,

2009). Como se puede comprobar en la Figura 15, el porcentaje de células $CD4^+IL-17^+$ en los ganglios linfáticos antes de la inmunización con CII fue similar en ambos grupos experimentales. Sin embargo, mientras que en el ratón B10RIII-BAMBI^{+/+} se producía una expansión muy significativa de esta población a las tres semanas de la inmunización con CII, el porcentaje de linfocitos Th17 se incrementó marginalmente en los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-} inmunizados (**Figura 15**).

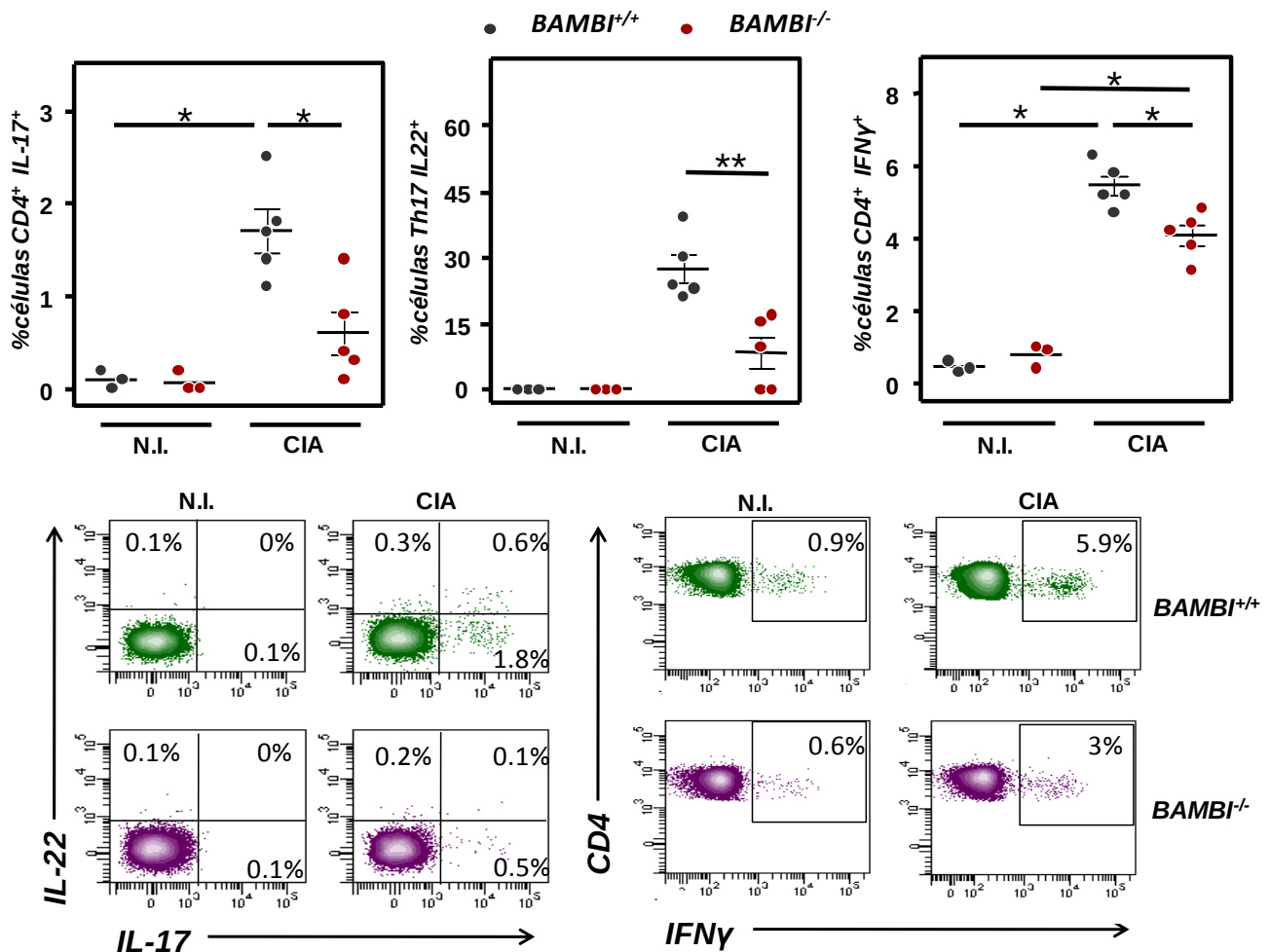
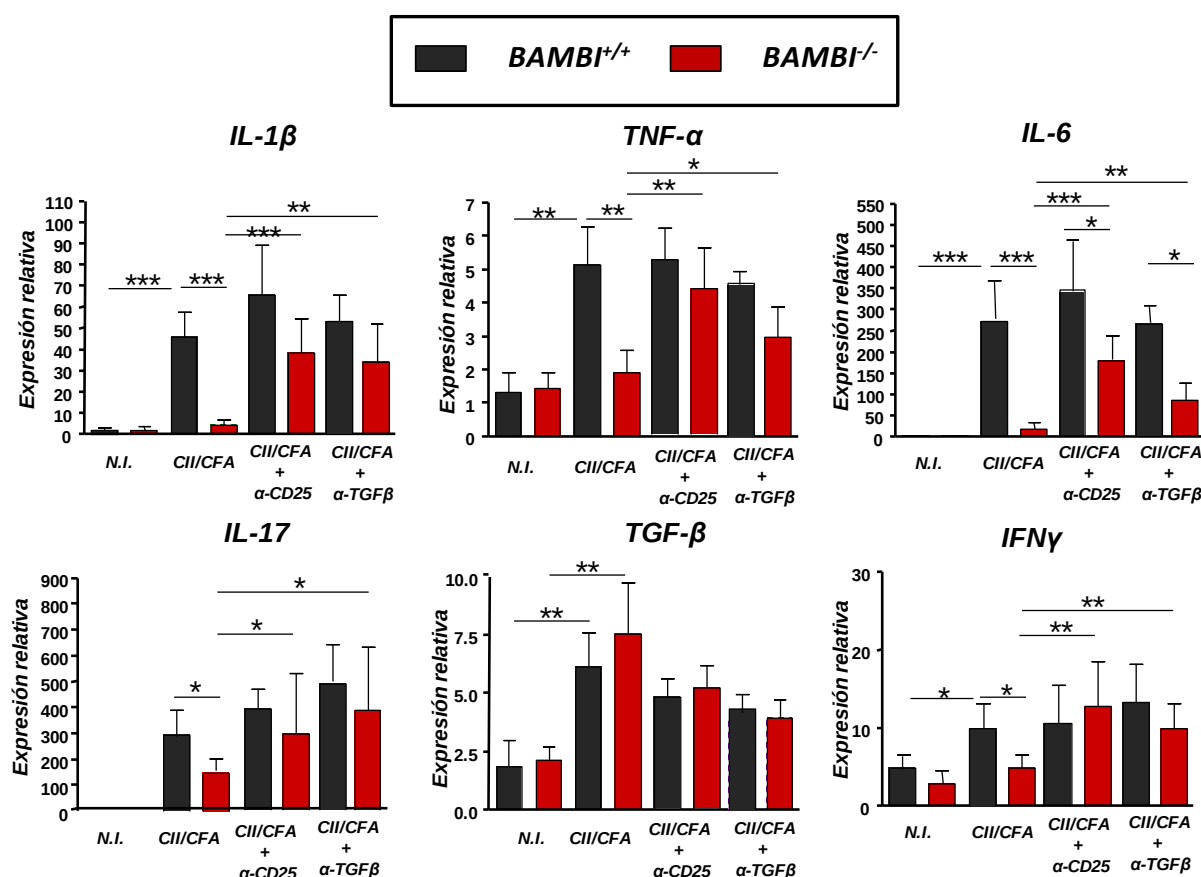


Figura 15. Porcentaje de las poblaciones de Th17 y Th1. Animales no inmunizados e inmunizados con CII, a día 21 en ganglios linfáticos. Arriba, gráfica con los porcentajes de células Th17 (y dentro de estas las que son IL-22⁺) y de células Th1 ($CD4^+IFN\gamma^+$). Abajo, detalle de la citometría de flujo con AcM para IL-22 y IL-17 dentro de las CD4 para Th17, y con AcM para CD4 y IFNγ para Th1. Los valores que se muestran indican el porcentaje dentro de los linfocitos T-CD4⁺. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de Mann Whitney se indican como: *(p<0.05), **(p<0.01).

Así mismo, la fracción de linfocitos Th17 productores de IL-22 tras inmunización fue significativamente superior en los ratones B10RIII-BAMBI^{+/+} que el los B10RIII-BAMBI^{-/-} (**Figura 15**). El análisis de la población Th1 en el transcurso de la CIA mostró de nuevo un incremento significativamente mayor en los ratones B10RIII-BAMBI^{+/+} que el los B10RIII-BAMBI^{-/-} tras la inmunización con CII (**Figura 15**). Por último, comparamos el perfil de expresión génica a nivel articular de citocinas pro- y anti-inflamatorias relevantes en CIA entre los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-} y B10RIII-BAMBI^{+/+} antes y 8 semanas tras la inmunización con CII. Como cabía esperar, los niveles articulares de RNAm de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF α e IL-6 se incrementaron significativamente tras la inmunización con CII en los ratones B10RIII-BAMBI^{+/+} (**Figura 16**).



En estos ratones también se observó un incremento significativo en la expresión articular de IL-17A, IFN γ y TGF β tras la inmunización con CII (**Figura 16**). En correlación con el desarrollo de una CIA muy leve, en los ratones B10RIII-BAMBI $^{-/-}$ la expresión articular de la mayoría de citocinas mencionadas anteriormente no sufrió cambios significativos tras la inmunización con CII (**Figura 16**). La única excepción la constituyó la IL-17A, cuya expresión articular se incrementó en estos animales tras la inmunización con CII aunque sus niveles fueron significativamente menores que los observados en los ratones B10RIII-BAMBI $^{+/+}$ inmunizados (**Figura 16**). En conjunto, nuestros resultados muestran claramente una evolución mucho menos severa de la artritis en los ratones deficientes en BAMBI en asociación con una alteración en el perfil de activación de las diferentes subpoblaciones funcionales de linfocitos T-CD4 $^{+}$.

10.- LAS CÉLULAS T REGULADORAS Y EL TGF β PARTICIPAN EN LA PROTECCIÓN FRENTE AL DESARROLLO DE CIA DE LOS RATONES BAMBI $^{-/-}$

Para profundizar en el estudio de los mecanismos responsables de la protección frente al desarrollo de CIA en los ratones B10RIII-BAMBI $^{-/-}$ y en vista de los cambios que la deficiencia en esta molécula causa en la población de linfocitos Tregs, se valoró el desarrollo de CIA en los diferentes grupos experimentales tras la eliminación de estas células con un AcM citotóxico anti-CD25. Grupos de animales B10RIII-BAMBI $^{-/-}$ y B10RIII-BAMBI $^{+/+}$ fueron inmunizados con CII y tratados a partir del día 13 post-inmunización (p.i.) hasta el momento del sacrificio (con PBS (controles) o con anti-CD25 (ver material y métodos). El tratamiento se inició en ese momento para evitar la eliminación de células efectoras con potencial artrítico, ya que estas expresan la molécula CD25 de forma rápida y transitoria tras su activación (Lin *et al.*, 1997). La eliminación de las células CD25 $^{+}$ modificó sustancialmente la evolución clínica en los ratones B10RIII-BAMBI $^{-/-}$ aumentando la incidencia y la severidad de la artritis hasta niveles similares a los observados en los ratones B10RIII-BAMBI $^{+/+}$ independientemente del tratamiento (**Figura 17A**). El análisis radiológico de estos animales confirmó los hallazgos clínicos, apreciándose en las patas de los ratones B10RIII-BAMBI $^{-/-}$ tratados con el AcM anti-CD25 alteraciones óseas y articulares similares a las observadas en los ratones B10RIII-BAMBI $^{+/+}$ inmunizados (**Figura 17B y 17C**).

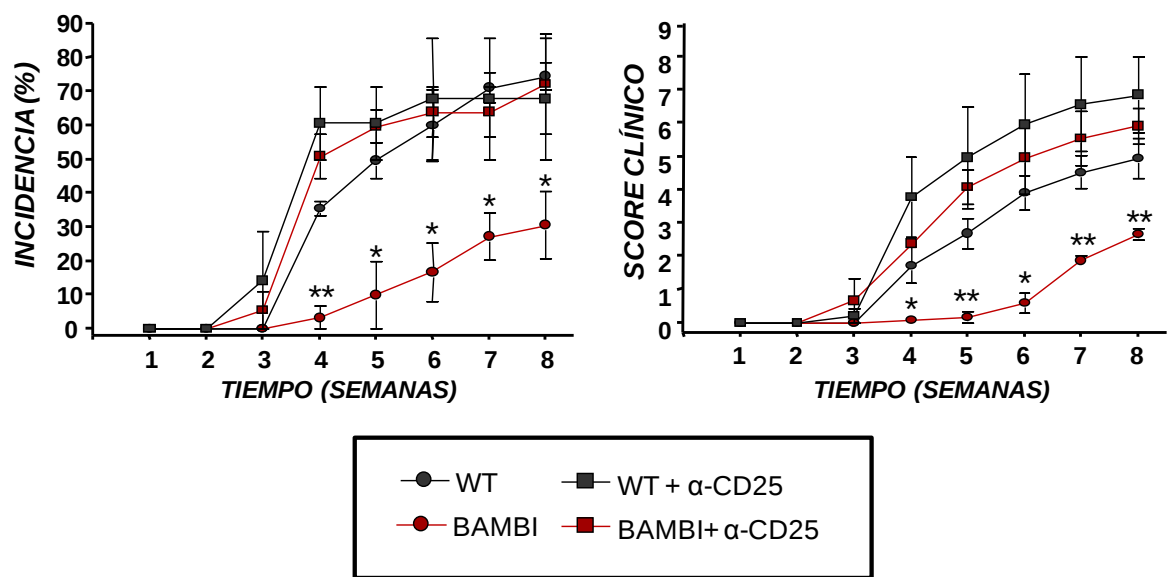
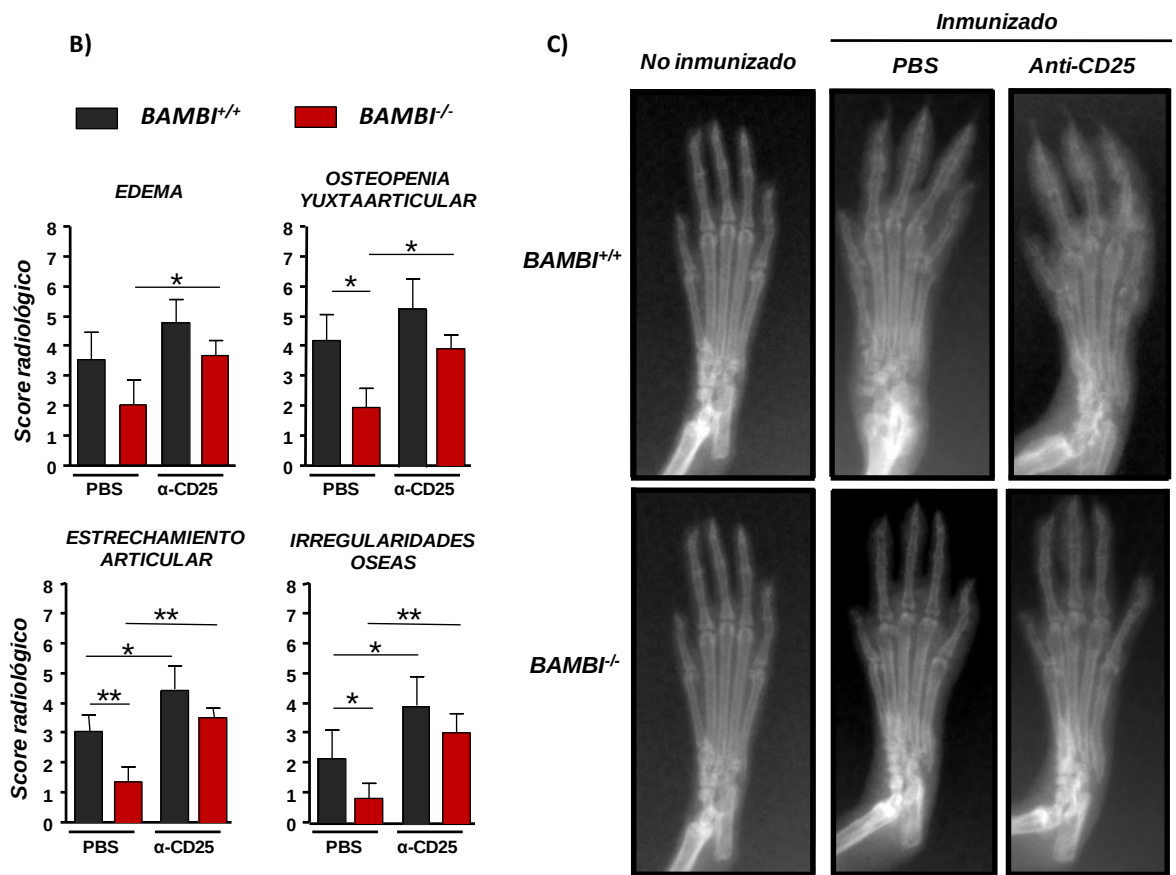


Figura 17A. Porcentaje de incidencia y score clínico de severidad durante las 8 semanas tras la inducción de CIA. Ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} con y sin tratamiento anti-CD25 durante las 8 semanas tras la inmunización. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de Mann Whitney se indican como: * (p < 0.05), ** (p < 0.01).



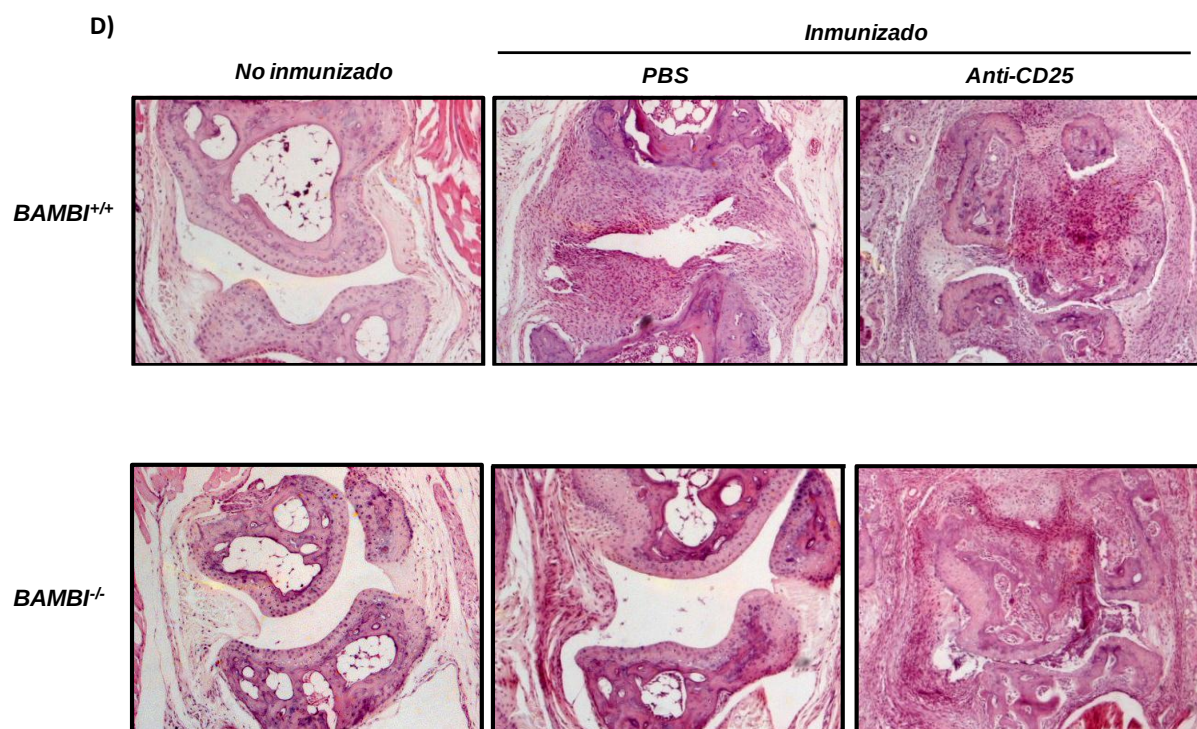


Figura 17 B, C y D. Análisis radiológico y anatomopatológico de las extremidades de los ratones BAMBI^{+/+} y BAMBI^{-/-} a las 8 semanas de la inmunización, con y sin tratamiento anti-CD25. B) Gradación de las lesiones radiológicas de los 4 parámetros principales de lesiones a nivel articular. Las graficas representan la media $\pm$ SD de la suma de los scores de las 4 extremidades. C) Imágenes radiológicas representativas del tarso y las falanges de los distintos grupos de ratones. D). Imágenes representativas de la histología tomadas con el objetivo 10x, de cortes teñidos con H&E. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Mann Whitney se indican como: *($p < 0.05$), **($p < 0.01$).

Como ya se ha comentado anteriormente, el TGF β es una citocina inmunomoduladora producida por una gran variedad de células, que juega un importante papel en el desarrollo y función de ciertas subpoblaciones linfocitarias. Una de las principales funciones que se le atribuyen es la mediación en la actividad de las células Treg, suprimiendo respuestas inmunes *in vivo* (Huber *et al.*, 2004; Gil-Guerrero *et al.*, 2008). Por estos motivos y teniendo en cuenta nuestros resultados anteriores, se valoró el papel de esta citocina en la protección frente al desarrollo de CIA, mediada por linfocitos Tregs, observada en los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-}. Para ello, se inyectó un AcM bloqueante anti-TGF β por vía s.c. en la pata derecha de los ratones inmunizados cada dos días (llegando a una dosis total de 150 μ g/semana), desde el día 11 p.i. hasta la semana 8^a, momento del sacrificio. Como control sin tratamiento se utilizaron las patas izquierdas de los mismos ratones, a las que se inyectó PBS. Al igual que lo descrito anteriormente, la mayoría de las patas tratadas con PBS de los ratones B10RIII-BAMBI^{-/-} y B10RIII-BAMBI^{+/+} inmunizados estaban protegidas o desarrollaron CIA, respectivamente (**Figura 18A**). Sin embargo, el

tratamiento local con el AcM anti-TGF β dio lugar a un incremento en la severidad clínica de la CIA en las patas de los ratones B10RIII-BAMBI $^{-/-}$, perdiéndose la protección al desarrollo de la enfermedad.

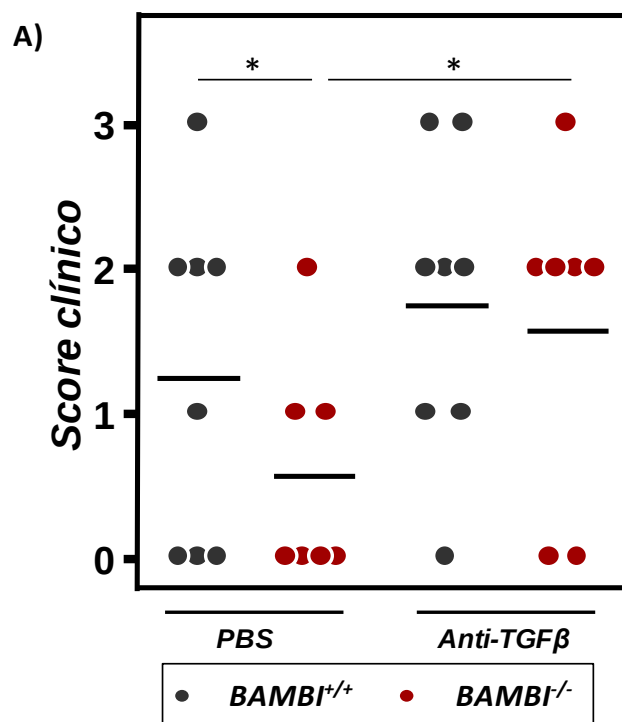


Figura 18A. Score clínico de severidad de cada pata a las 8 semanas tras la inducción de CIA. Patas de los ratones BAMBI $^{+/+}$ (color negro) y BAMBI $^{-/-}$ (color rojo) tratadas con PBS o con anti-TGF β . Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Mann Whitney se indican como: *($p < 0.05$).

El análisis radiológico mostró la existencia de lesiones óseas importantes en las patas tratadas con PBS de los ratones B10RIII-BAMBI $^{+/+}$ y ligeramente mayores en aquellas tratadas con el AcM anti-TGF β (**Figura 18B y 18C**). Por su parte, en las patas tratadas con PBS de los ratones B10RIII-BAMBI $^{-/-}$ únicamente se observó un ligero edema de partes blandas, con mínima afectación articular. Sin embargo, la eliminación local de TGF β dio lugar a una pérdida de la protección, apareciendo estrechamiento de los espacios articulares, erosiones marginales e incluso zonas con sobrecrecimiento óseo (**Figura 18B y 18C**).

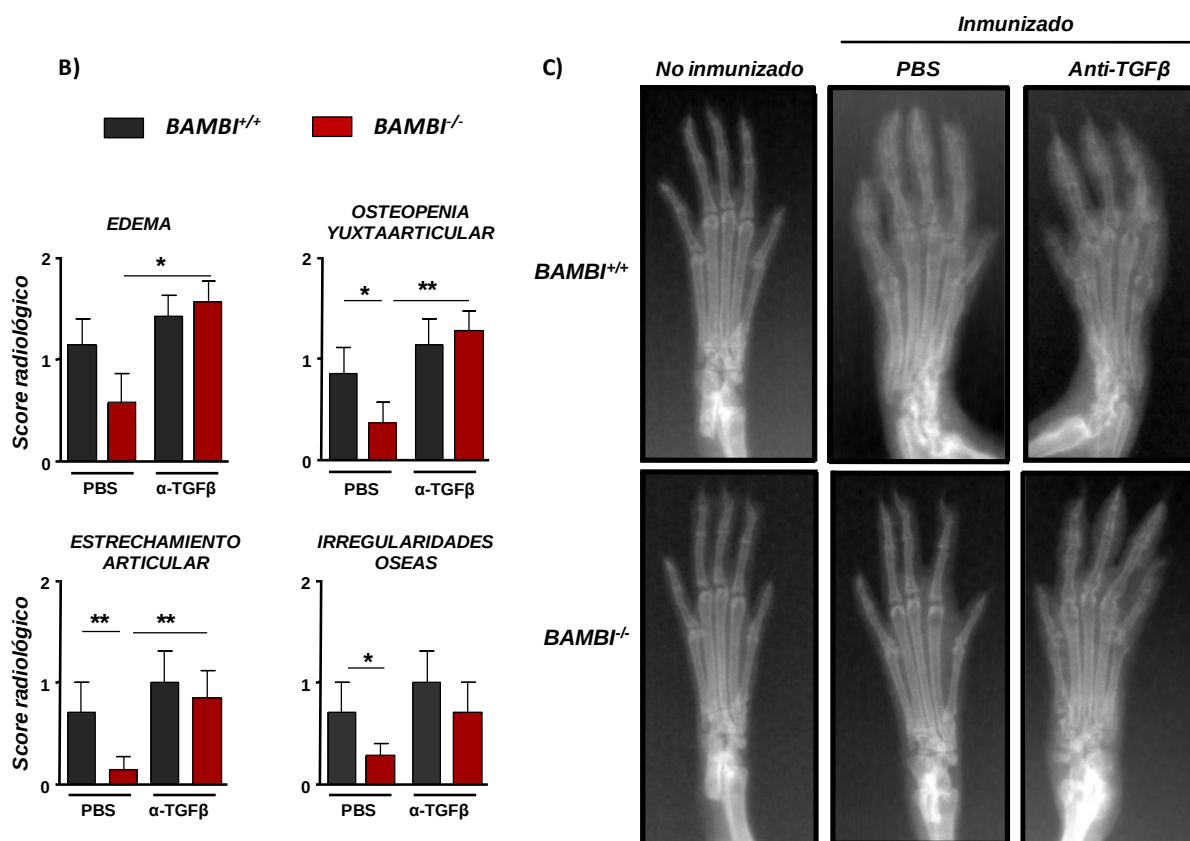
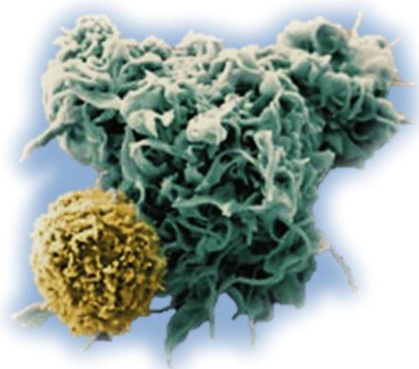


Figura 18 B y C. Analisis radiológico de las extremidades de los ratones *BAMB1*^{+/+} y *BAMB1*^{-/-} a las 8 semanas de la inmunización, con y sin tratamiento anti-TGFβ. B) Gradación de las lesiones radiológicas a las 8 semanas tras la inducción de CIA, de los 4 parámetros principales que indican presencia de lesiones a nivel articular. Las graficas representan la media $\pm$ SD de la suma de los scores de las 4 extremidades. C) Imágenes radiológicas del tarso y las falanges tomadas a las 8 semanas tras inducción de CIA en ambos grupos de ratones. Se muestran imágenes representativas de las patas traseras. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de Mann Whitney se indican como: *($p < 0.05$), **($p < 0.01$).

En correlación con los hallazgos clínicos y radiológicos, el perfil de expresión articular de citocinas cambió drásticamente en los ratones B10RIII-*BAMB1*^{-/-} tras la eliminación de los linfocitos Tregs o el bloqueo local de TGFβ (**Figura 16**). Aunque existen diferencias en la expresión articular de las diferentes citocinas en respuesta a cada uno de los tratamientos en los ratones B10RIII-*BAMB1*^{-/-}, en general estos se asocian a un incremento en sus niveles articulares de RNAm en asociación con la pérdida de la protección contra el desarrollo de CIA (**Figura 16**). Así mismo, la expresión articular de todas las citocinas, salvo la de IL-6, se iguala entre los ratones B10RIII-*BAMB1*^{-/-} y B10RIII-*BAMB1*^{+/+} tras los diferentes tratamientos (**Figura 16**).

En conclusión, nuestro estudio demuestra claramente el papel preponderante de BAMBI en la homeostasis linfocitaria, regulando la diferenciación y actividad funcional de diversas subpoblaciones funcionales de linfocitos T-CD4⁺ y de esta forma, ejerciendo una actividad dominante en el control de la tolerancia inmunológica y el consiguiente desarrollo de patologías autoinmunes.

V.DISCUSIÓN



V. DISCUSIÓN

Los TGF β s y dentro de estos fundamentalmente el TGF β 1, constituyen una familia de factores de crecimiento con un amplísimo espectro funcional en el SI (Letterio and Roberts, 1998; Dobaczewski *et al.*, 2011). En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en comprender un aspecto aparentemente contradictorio de los TGF β s en el SI; su capacidad de inducir la diferenciación de los linfocitos T-CD4⁺ activados hacia dos subpoblaciones funcionales con actividades antagónicas: por un lado, la subpoblación de linfocitos Tregs con actividad supresora y por otro lado, las células Th17 con potencial pro-inflamatorio. Por lo tanto cualquier perturbación en la señalización por TGF β suele estar asociado a fenómenos de inflamación y autoinmunidad (Shull *et al.*, 1992). Múltiples estudios han demostrado claramente que esta actividad dual de los TGF β s sobre los linfocitos T-CD4⁺ depende en gran medida de la ausencia (Treg) o presencia (Th17) en el entorno de citocinas con actividad pro-inflamatoria, fundamentalmente la IL-6 (Bettelli *et al.*, 2006). Sin embargo, otros factores inherentes a la propia señalización celular de TGF β parecen desempeñar también un papel importante en esta decisión. En este sentido, recientemente hemos demostrado que los niveles de expresión del inhibidor del ciclo celular p27 influyen positivamente la diferenciación de las células T-CD4⁺ hacia linfocitos Tregs mediante el incremento en la intensidad de la señalización por los TGF β s (Iglesias *et al.*, 2013), lo que pone en evidencia la existencia de un nuevo nivel de regulación, que actuando como un sensor de la intensidad de la señalización celular, es capaz de dirigir el potencial diferenciador de esta citocina hacia cada uno de estos destinos funcionales antagónicos. Con esta premisa, nos propusimos la búsqueda y caracterización de otras proteínas que participasen en este hipotético sensor molecular de la señalización por TGF β y que pudiesen influenciar la diferenciación y la actividad funcional de las células Tregs y/o Th17 y como consecuencia de ello, el desarrollo de patologías autoinmunes.

Como se ha descrito en la Introducción, la señalización celular de la familia TGF β está estrechamente regulada a través de diversos factores entre los que se encuentra BAMBI, una proteína de membrana que inhibe la transducción de señales tras la activación de los receptores de TGF β s por sus ligandos (Onichtchouk *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2007). BAMBI no es imprescindible para el desarrollo embrionario y los ratones deficientes en este pseudo-receptor no muestran un fenotipo alterado desde el punto de vista macroscópico (Chen *et al.*, 2007; Tramullas *et al.*, 2010). Sin embargo, los ratones BAMBI^{-/-} presentan una menor sensibilidad al

dolor y desarrollan una fibrosis cardíaca acelerada tras sobrecarga ventricular (Tramullas *et al.*, 2010; Villar *et al.*, 2012), lo que sugiere su posible implicación en la regulación de fenómenos inflamatorios. Por este motivo, nos propusimos analizar en primer lugar la expresión de BAMBI en el SI. Nuestros resultados muestran que BAMBI se expresa tanto en timo como en bazo y además su expresión es inducible en las células T-CD4⁺ tras la activación a través del TCR y de CD28 y que TGFβ regula positivamente dicha expresión. Estos resultados constituyeron la premisa inicial sobre la que nos basamos para la realización de los estudios funcionales posteriores, utilizando una línea de ratones deficientes en BAMBI descrita previamente (Tramullas *et al.*, 2010). Un análisis inicial de estos animales mutantes muestra un mayor incremento en la intensidad de la señalización canónica por TGFβ en los linfocitos T CD4⁺ activados, realizada mediante la cuantificación de los niveles de pSMAD-3 que el observado en los ratones control. Aunque en nuestro estudio no hemos valorado el estado de las rutas de señalización de TGFβ no-canónicas en los linfocitos T, otros grupos ya han demostrado un aumento en la activación de dichas rutas (TAK1-p38 y TAK1-JNK) en el miocardio de estos mismos animales (Villar *et al.*, 2012).

Todas estas circunstancias y otras que comentaremos seguidamente, junto con estudios previos de nuestro grupo que mostraban como el aumento en la señalización por TGFβ en los linfocitos T prevenía del desarrollo de autoinmunidad (Iglesias *et al.*, 2013), nos condujeron a estudiar en profundidad las características del sistema inmunológico en el ratón deficiente para BAMBI. Para abordar estas cuestiones analizamos las principales poblaciones linfocitarias en el timo y el bazo de estos animales. Sabemos que distintos miembros de la superfamilia de TGFβ se expresan en timo regulando el desarrollo de linfocitos T, y que linfocitos SP tanto T-CD4⁺ como T-CD8⁺ son capaces de responder al TGFβ (Rosendahl *et al.*, 2003) pero el papel desempeñado por TGFβ en el desarrollo de los linfocitos T en el timo es todavía confuso. Por un lado, se ha descrito una caída de dos veces en el número de timocitos T-CD8⁺ maduros en ratones deficientes en TβRII selectivamente en linfocitos T (Li *et al.*, 2006), lo que sugiere un papel de esta citocina como inductora de la maduración de esta población linfocitaria. Sin embargo, otros autores no han observado dichos cambios en el mismo modelo experimental (Marie *et al.*, 2006). Por otro lado, ratones Tg para un dominante negativo de este TβRII en células T, en donde la señalización por TGFβ también está bloqueada o al menos atenuada, desarrollan un cuadro linfoproliferativo secundario a la expansión periférica de linfocitos T-CD8⁺, aunque el desarrollo tímico de esta población parece ser normal (Lucas *et al.*, 2000). Nuestros resultados ayudan poco a clarificar estas controversias. A diferencia de los modelos descritos anteriormente, en donde la

señalización por TGF β está bloqueada/atenuada, los ratones BAMBI $^{-/-}$ muestran un incremento en la señalización por TGF β en linfocitos T. Al contrario de lo que cabría esperar por alguno de los estudios comentados anteriormente, los ratones BAMBI $^{-/-}$ presentan una atrofia tímica severa que se traduce en una producción deficiente de linfocitos T-CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ maduros. Varias posibilidades podrían explicar esta aparente controversia aunque no han sido analizadas en el presente trabajo. En primer lugar, en el estudio realizado por Li y colaboradores se utilizaron ratones con una inhibición selectiva de la señalización por TGF β , mientras que en los ratones BAMBI $^{-/-}$ también podría estar afectada la señalización por otros miembros de esta superfamilia de factores de crecimiento tales como las activinas y los BMPs, los cuales han sido implicados igualmente en el desarrollo de los linfocitos T en el timo (Licona-Limón *et al.*, 2005; Bleul *et al.*, 2005). Por otro lado, además de actuar como un inhibidor de la señalización por TGF β , BAMBI parece regular positivamente la señalización de wnt/ β -catenina, muy importante tanto en la proliferación celular como en el desarrollo tímico (Staal *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2008). A diferencia del timo, el tamaño y la celularidad de los bazo en los ratones BAMBI $^{-/-}$ fue similar al observado en los ratones controles BAMBI $^{+/+}$. Con la edad se aprecia, sin embargo, un ligero, aunque significativo, incremento en el número de linfocitos T-CD4 $^{+}$ en detrimento de los T-CD8 $^{+}$ y un aumento significativo en el número de linfocitos B. Estos hallazgos son compatibles con los observados en dos líneas independientes de ratones Tg para un dominante negativo de este T β R II en células T (Lucas *et al.*, 2000; Gorelik and Flavell, 2000).

Debido a la importancia de las Tregs en el control de la proliferación linfocitaria y el mantenimiento de la tolerancia periférica, el presente trabajo ha prestado una atención especial a la implicación de BAMBI en la biología de estos linfocitos. A pesar de las alteraciones en la homeostasis de los linfocitos T mencionadas anteriormente, el tamaño global de la población Treg en el timo de los ratones BAMBI $^{-/-}$ se mantuvo en rangos similares a la observada en los ratones BAMBI $^{+/+}$. De hecho, cabe destacar un incremento relativo en el porcentaje de estas células dentro de la población de timocitos maduros que compensa la reducción en la celularidad general del órgano. Recientemente, se ha demostrado que TGF β protege tanto a los linfocitos Treg como a los T convencionales de la apoptosis inducida en el timo tras interacción con autoantígenos, a través de la regulación de genes anti-apoptóticos (Bcl-2) y pro-apoptóticos (Bim, Bak y Bax) de la familia de Bcl-2 (Ouyang *et al.*, 2010). Sin embargo, queda por esclarecer el porqué de la selectividad que este efecto de TGF β muestra en la población de linfocitos Treg en los ratones BAMBI $^{-/-}$. Una posibilidad es que el desarrollo de células Treg en el timo se produce

de una manera IL-2-dependiente a partir de precursores T-CD4⁺ simples positivos que expresan CD25 antes incluso que Foxp3, el cuál se induciría posteriormente en un proceso guiado y regulado a través de la señalización por IL-2 (Lio and Hsieh, 2008). En este sentido y como se discutirá posteriormente, los ratones BAMBI^{-/-} presentan una señalización por IL-2 incrementada en los linfocitos Tregs y/o sus precursores, asociada con un incremento en la expresión de CD25.

De nuevo, a diferencia de lo observado en el timo, el porcentaje y número total de células Treg en el bazo de los ratones BAMBI^{-/-} fue similar al encontrado en los controles BAMBI^{+/+}. En cambio, se observaron alteraciones en la distribución de las poblaciones de linfocitos Tregs, definidas en función de la expresión de Helios, un factor de transcripción de la familia de Ikaros (Cobb and Smale, 2005), entre ambas cepas de animales. Estudios recientes han propuesto a Helios como un marcador restringido a la subpoblación de linfocitos Tregs de origen tímico o nTregs, a diferencia de las células iTregs, inducidas en la periferia a partir de precursores CD4⁺CD25⁻, que son Helios⁻ (Thornton *et al.*, 2010). Estas conclusiones han sido cuestionadas posteriormente por otros autores que postulan que la pérdida de la expresión de Helios en linfocitos Tregs es indicativo de la activación de estas células en el contexto de respuestas inmunes antígeno-específicas (Akimova *et al.*, 2011). Independientemente de que se traten de células iTregs o Tregs activadas, el aumento en la proporción de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Helios⁻ en relación a las CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Helios⁺ en los bazos de los ratones BAMBI^{-/-} refleja la existencia de alteraciones homeostáticas en esta población celular en el contexto de una señalización por TGFβ incrementada. Diferentes hallazgos adicionales apoyan esta observación. En primer lugar, los linfocitos T-CD4⁺ naïve de los ratones BAMBI^{-/-} poseen una mayor capacidad para diferenciarse a células iTregs que los de los ratones BAMBI^{+/+} tras su activación *in vitro* en presencia de TGFβ. Este fenómeno probablemente esté en relación con el incremento en la activación de las rutas canónicas de señalización por TGFβ observada en los linfocitos T CD4⁺ de estos animales. De hecho, en la señalización a través de TGFβ durante la diferenciación a linfocitos iTreg es prioritaria la ruta canónica (Smad-dependiente) (Lu *et al.*, 2010), donde Smad-3 y NFAT se unen directamente al amplificador del gen de *foxp3* induciendo su expresión (Tone *et al.*, 2008). Además se ha demostrado que la diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo* a linfocitos iTreg se ve comprometida en ausencia de Smad-2 y Smad-3 (Jana *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). En segundo lugar, en los ratones BAMBI^{-/-} observamos una cinética de inducción/expansión de

linfocitos Tregs acelerada en los ganglios linfáticos regionales tras la inmunización con una antígeno T-dependiente en comparación con la observada en los controles BAMBI^{+/+}. Por último, recientemente hemos descrito resultados similares en un modelo experimental de ratones Tg para Bcl-2 en linfocitos T, en donde igualmente se observa un incremento en la señalización por TGFβ en los linfocitos T en asociación con una mayor expresión de p27 (Iglesias *et al.*, 2013).

Junto con las alteraciones descritas anteriormente, los linfocitos Tregs de los ratones BAMBI^{-/-} presentan anomalías intrínsecas con importantes consecuencias potenciales en su funcionalidad. Mientras que no se apreciaron cambios en la expresión de FoxP3, CTLA-4 y GITR (resultados no mostrados para estos dos últimos marcadores) entre los linfocitos Tregs de los ratones BAMBI^{-/-} y BAMBI^{+/+}, la expresión de CD25 en estas células fue significativamente mayor en los ratones BAMBI^{-/-}. Además, la inducción de CD25 en los linfocitos T-CD4⁺ estimulados *in vitro* a través del TCR y CD28 en presencia de IL-2 y TGFβ fue también superior en los ratones BAMBI^{-/-} que en los BAMBI^{+/+}. La expresión incrementada de CD25 tiene repercusiones funcionales importantes ya que la inducción/expansión de linfocitos Tregs en respuesta a la administración *in vivo* de complejos inmunes IL-2-anti-IL-2 (Boyman *et al.*, 2006) fue mayor en estos animales mutantes, indicando que la señalización linfocitaria por esta citocina también se encuentra incrementada en ausencia de BAMBI. La expresión de CD25 en linfocitos T está sujeta a una estricta regulación a nivel transcripcional (Liao *et al.*, 2013). Estudios de Kim y cols. han demostrado la presencia de una región reguladora positiva (PRR) en el promotor de CD25, denominada PRRV, que contiene un motivo de unión a Smad-3 y que es responsable del efecto positivo de TGFβ1 en la inducción de la cadena α del IL-2R (Kim *et al.*, 2005). Aunque en nuestro estudio no hemos analizado los mecanismos responsables del incremento en la expresión de CD25 tanto en Tregs como tras la activación de los linfocitos T-CD4⁺ *naïve* en los ratones BAMBI^{-/-}, el hecho de que en estos animales estén potenciadas las rutas de señalización canónica de TGFβ, apunta a que tanto Smad-2 como Smad-3 se encuentren implicadas en este fenómeno.

Una característica adicional observada en los linfocitos Treg de los ratones BAMBI^{-/-} es el incremento en su actividad supresora *in vitro*. Se han caracterizado varios mecanismos por los cuales las células Treg ejercen su actividad supresora. Uno de estos mecanismos parece estar en relación con la expresión de CD25 y la capacidad que tienen estas células de consumir la IL-2 del entorno, privando a los

linfocitos efectores de los efectos proliferativos de esta citocina (Pandiyar *et al.*, 2007). En base a ello, es tentativo especular que el aumento en la expresión de CD25, y por lo tanto el receptor de alta afinidad de la IL-2, pueda también estar involucrado, al menos parcialmente, en el incremento en la actividad supresora de esta población celular en los ratones deficientes en BAMBI.

Los resultados discutidos hasta el momento indican que la deficiencia en BAMBI ocasiona profundas alteraciones en la biología de las células Tregs tanto en sus mecanismos homeostáticos como en su actividad funcional. Estas alteraciones podrían estar en relación con la expresión en su superficie de niveles elevados del receptor de alta afinidad de la IL-2 como consecuencia posiblemente del incremento en la señalización celular por TGF β . Sin embargo, alguno de nuestros hallazgos indica que la potenciación de la señalización celular por TGF β tras la deficiencia en BAMBI también afecta a los linfocitos Tregs por mecanismos parcialmente independientes de las alteraciones inducidas en la señalización por IL-2. Esto es particularmente cierto al menos en lo referente a la diferenciación *in vitro* de iTregs. Así, mientras que el bloqueo de la IL-2, mediante la adición al cultivo anticuerpos específicos, inhibe casi por completo la diferenciación a iTregs de las células T-CD4⁺ de los ratones controles, esta inhibición fue significativamente menor en el caso de los linfocitos T-CD4⁺ de los ratones BAMBI^{-/-}. En este mismo sentido, la potenciación de la señalización linfocitaria por TGF β dependiente de p27 observado en los ratones que sobre-expresan Bcl-2 en linfocitos T, provoca, como se comentó anteriormente, un incremento tanto en la capacidad de los linfocitos T-CD4⁺ *naïve* a diferenciarse *in vitro* a iTreg como en su actividad supresora. Sin embargo, estas alteraciones de la biología de los linfocitos Tregs se produjeron en ausencia de cambios aparentes en la expresión de CD25 o en la señalización de IL-2 en estas células (Iglesias *et al.*, 2013).

En paralelo con los efectos sobre el desarrollo y funcionalidad de las células Treg comentados anteriormente, nuestro estudio demuestra que BAMBI también está implicado en el desarrollo de los linfocitos Th17. Así, la diferenciación *in vitro* de células Th17 a partir de linfocitos T-CD4⁺ *naïve* en condiciones de cultivo estándar (0.5ng/ml TGF β + 10ng/ml IL-6) está fuertemente inhibida en los ratones BAMBI^{-/-} en comparación con los BAMBI^{+/-}. Estos resultados *in vitro* fueron posteriormente confirmados *in vivo*, observándose una inhibición de la inducción/expansión de linfocitos Th17 en los ganglios linfáticos regionales de los ratones BAMBI^{-/-} a las tres semanas tras la inmunización con CII-CFA. El defecto en la inducción de células

Th17 en los ratones BAMBI^{-/-} fue parcialmente reversible, al menos *in vitro*, al incrementarse las concentraciones de IL-6 en el medio. Varios mecanismos no excluyentes entre sí pueden ser responsables de este fenómeno. En primer lugar, el defecto en la inducción de linfocitos Th17 en los ratones BAMBI^{-/-} podría estar asociado a la inducción incrementada y paralela de linfocitos Tregs capaces de bloquear la producción/expansión de linfocitos con capacidad inflamatoria. De hecho, en los ratones BAMBI^{-/-} la eliminación de los linfocitos Tregs con un AcM anti-CD25 citotóxico, promueve el desarrollo de una CIA severa asociada al incremento en la expresión articular de IL-17A (ver posteriormente). Sin embargo, no hemos observado una diferenciación de los linfocitos T-CD4⁺ *naïve* de los ratones BAMBI^{-/-} a iTregs en condiciones de polarización Th17.

Diversos estudios han demostrado el efecto negativo de la IL-2 sobre la diferenciación Th17. Por un lado, la IL-2 inhibe la expresión de la cadena β del receptor de la IL-6 (IL-6 β R) en la superficie de los linfocitos T-CD4⁺ activados reduciendo de esta forma la activación de STAT-3 y la inducción ROR γ t (Liao *et al.*, 2011). Además, la IL-2 inhibe la producción de IL-17A incluso en células que expresan de forma constitutiva IL-6 β R, indicando la existencia de mecanismos independientes de IL-6 por los que la IL-2 regula negativamente la inducción de células Th17 (Liao *et al.*, 2011). Por último, se ha demostrado que STAT-5 activado por IL-2 inhibe la unión de STAT-3 al promotor de IL-17 compitiendo por el mismo sitio de unión (Yang *et al.*, 2011). En vista de estos antecedentes, es concebible que el defecto en la inducción de linfocitos Th17 observado en los ratones BAMBI^{-/-} podría relacionarse con el incremento en la expresión de CD25, y por lo tanto del IL-2R de alta afinidad, en sus linfocitos T-CD4⁺ activados. En este sentido, la diferenciación *in vitro* a células Th17 de los linfocitos T-CD4⁺ de los ratones BAMBI^{-/-} se recupera parcialmente tras la adición al cultivo de AcM anti-IL-2, alcanzándose una diferenciación similar a la observada en los cultivos de linfocitos T-CD4⁺ *naïve* de los ratones BAMBI^{+/+} sin anti-IL-2 pero todavía significativamente inferior a la obtenida con estos controles en presencia de anti-IL-2.

Independientemente de la presencia o no de IL-6 en el entorno, la señalización por el TGF β durante la estimulación de las células T-CD4⁺ *naïve* a través del TCR promueve la inducción transcripcional tanto de Foxp3 como de ROR γ t (Veldhoen *et al.*, 2006), mediante la activación de las rutas de señalización Smad-dependientes (FoxP3) y Smad-independientes (ROR γ t; a través de JNK y p38) (Yang *et al.*, 2008b; Lu *et al.*, 2010). Así, en estos estadios iniciales de diferenciación los linfocitos T

CD4⁺ tienen la potencialidad de diferenciarse hacia células Th17 o Tregs. Si la señalización vía Foxp3 persiste en el tiempo, este factor de transcripción es capaz de actuar como un regulador negativo de la diferenciación Th17 antagonizando directa o indirectamente la actividad de ROR γ t (Ivanov *et al.*, 2007; Ichiyama *et al.*, 2008). Además, Foxp3 puede interactuar con e inhibir a RUNX1, un factor de transcripción involucrado en la activación de la señalización a través de citocinas pro-inflamatorias (Zhang *et al.*, 2008). En presencia de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-21, IL-23) y bajas concentraciones de TGF β se induce la expresión de ROR γ t, mientras que tanto la expresión como la función del Foxp3 son inhibidas ((Zhou *et al.*, 2008). Sin embargo, en estas condiciones de diferenciación Th17, la activación excesiva de las rutas canónicas de señalización por TGF β observada en los linfocitos T-CD4⁺ de los ratones BAMBI^{-/-} podría tener un efecto dominante sobre las rutas no-canónicas, promoviendo la estabilización de FoxP3 por un periodo de tiempo lo suficientemente largo para modular la diferenciación Th17 pero no para promover la diferenciación Treg. Esta posibilidad está siendo analizada en la actualidad.

Uno de los aspectos más relevante del presente trabajo es la constatación de que la deficiencia en BAMBI, alterando la diferenciación funcional de los linfocitos T-CD4⁺, tiene consecuencias sobre el desarrollo de lesiones autoinmunes. Utilizando un modelo experimental de artritis reumatoide, la CIA, demostramos que los ratones BAMBI^{-/-} estaban protegidos frente al desarrollo de la enfermedad, valorada desde un punto de vista clínico, radiológico y anatomopatológico. Esta protección estaba asociada a una disminución en los niveles articulares de mRNA de las citocinas proinflamatorias características de esta patología (IL1 β , TNF α , IL-6, IL-17 e IFN γ), información fiable debido a la existencia de una buena relación entre los niveles de expresión de RNAm y proteína de estas citocinas a nivel articular (Rioja *et al.*, 2004). En correlación con estos datos, encontrábamos una deficiente inducción de células Th17 y dentro de éstas un porcentaje menor de células productoras de IL-22, consideradas las más inflamatorias y patogénicas dentro de las Th17 (Geboes *et al.*, 2009), lo que apoya los datos clínicos de la protección observada en los ratones BAMBI^{-/-} frente al desarrollo de CIA. Al mismo tiempo encontrábamos una expansión precoz en el porcentaje de células Tregs tras la inmunización y la protección frente al desarrollo de CIA en los ratones BAMBI^{-/-} es Treg-dependiente. Así, la eliminación *in vivo* de esta población, mediante la administración de un AcM anti-CD25 citotóxico, promueve el desarrollo de CIA en estos animales mutantes con características similares a la observada en los ratones BAMBI^{+/+} no tratados.

Nuestros resultados se suman a la bibliografía existente sobre la participación de las células Tregs en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y de cómo su modulación puede alterar la evolución de dichas patologías (Gonzalez-Rey *et al.*, 2006; Platten *et al.*, 2009; Iglesias *et al.*, 2013).

La inducción de CIA en los ratones tratados con AcM anti-CD25 se asocia con un incremento en la expresión articular de las citocinas pro-inflamatorias y Th17 mencionadas anteriormente, lo que constata que el efecto inhibitor sobre la diferenciación Th17 observada en los ratones BAMBI^{-/-} puede ser abolido en condiciones inflamatorias extremas, tal y como discutimos anteriormente. Diversos estudios han demostrado el papel patogénico de las células Th17 durante el desarrollo de CIA. Se ha observado que la neutralización de la citocina IL-17A reduce la inflamación articular y la destrucción articular y ósea en diferentes modelos de artritis (Bush *et al.*, 2002; Lubberts *et al.*, 2004). Del mismo modo, el bloqueo de la citocina IL-6 suprime el desarrollo de CIA debido a la inhibición de respuestas Th17 (Fujimoto *et al.*, 2008); y el mismo efecto es observado después del tratamiento con moléculas inmunomoduladoras que reducen esta población (Wang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011).

Como se comentó anteriormente, se ha sugerido que BAMBI, a parte de regular las vías de señalización de TGF β , puede estar involucrado en otras rutas de señalización celular tales como la de wnt/ β -catenina (Lin *et al.*, 2008). En nuestro estudio demostramos que el efecto protector sobre el desarrollo de CIA, y probablemente sobre el resto de los fenómenos descritos aquí, que se observa en los ratones BAMBI^{-/-} es dependiente de TGF β . Así, la administración de un AcM anti-TGF β a los ratones BAMBI^{-/-}, promueve el desarrollo de CIA en las patas tratadas, pero no en las patas contralaterales que recibieron PBS. TGF β es una citocina muy ubicua que presenta múltiples funciones en el sistema inmune como ya hemos visto, incluyendo la inducción y supervivencia de las células Tregs que a su vez producen TGF β como parte de su programa supresor, al menos *in vivo* (Chen *et al.*, 2003; Li and Flavell, 2008; Liu *et al.*, 2008; Ouyang *et al.*, 2010). Aunque en nuestro estudio no se identifica la fuente celular de TGF β responsable de la protección frente a la patología autoinmune en el ratón BAMBI^{-/-}, las similitudes en el desarrollo de CIA entre los ratones BAMBI^{-/-} tratados con AcM anti-CD25 y anti-TGF β apuntan a las células Tregs como responsables de este fenómeno. En este sentido, se ha descrito que ratones deficientes en TGF β 1 desarrollan una patología inflamatoria generalizada y letal que no es prevenida por la expresión ectópica de TGF β 1 activo

por el hígado, a pesar de presentar estos animales niveles normales de dicha citocina en el torrente circulatorio (Shull *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1993; Longenecker *et al.*, 2002). Sin embargo, esta patología inflamatoria severa desarrollada por el ratón deficiente en TGF β 1 se reproduce en gran parte en ratones que presentan una inactivación específica del gen de TGF β 1 en sus células T (Li *et al.*, 2007), lo que sugiere que la regulación en la producción de TGF β por ciertas poblaciones de células T y no otras poblaciones celulares, puede tener un profundo impacto en el control de patologías mediadas por células T como la CIA.

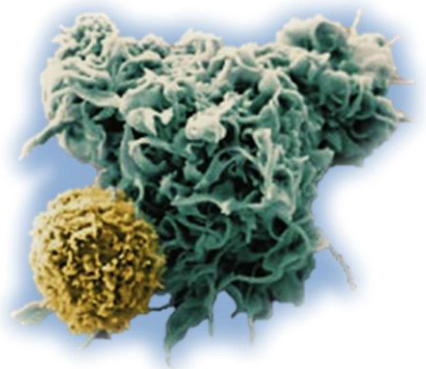
Con respecto a las respuestas inmunes humores, se ha demostrado que el TGF β 1 es uno de los principales factores inductores del cambio de clase a IgA. Así, ratones deficientes en TGF β 1 o con un defecto en el T β RII específicamente en células B presentan bajos niveles de esta Ig (van Ginkel *et al.*, 1999; Cazac and Roes, 2000) tanto en el suero como en las mucosas. En correlación con estos datos, a las células Tregs también se les atribuye una función en la regulación del cambio de clase a IgA como mecanismo de inmunorregulación, sobre todo a nivel intestinal, y este efecto es, en parte, debido a su producción de TGF β (Cong *et al.*, 2009). Se ha publicado que en las placas de peyer, las células Tregs pueden perder la expresión de Foxp3 y adquirir características de células Tfh, participando por lo tanto en la formación del centro germinal y el cambio de clase a IgA (Han *et al.*, 2009). El ambiente intestinal en el que se encuentran dichas células podría influir en su conversión en células productoras de IL-10 o en Tfh independientemente del antígeno que indujo su activación. Con este transfondo, el hallazgo de niveles elevados de autoAbs de tipo IgA sérica en los ratones BAMBI^{-/-} apoya la idea de un incremento en la actividad funcional de las células Tregs y de su señalización a través de TGF β .

Por otro lado encontramos una reducción en los niveles séricos de IgG anti-CII del subtipo IgG_{2a} cuya producción está regulada por citocinas de la subpoblación Th1 (Zhu and Paul, 2008). Estos títulos de autoanticuerpos están en sintonía con el hecho de que encontramos una reducción en la población de células CD4⁺IFN γ ⁺ (Th1) tras la inmunización con CII en los ganglios linfáticos del ratón BAMBI^{-/-}. Este efecto podría deberse a que BAMBI este también influenciando otras poblaciones T-CD4⁺ aparte de las Treg y Th17, que puedan estar jugando un papel en el desarrollo de la respuesta autoinmune. Aunque este aspecto no ha sido analizado en profundidad, nuestros estudios sobre el potencial de diferenciación *in vitro* de los

linfocitos T-CD4⁺ *naïve* hacia células Th1 no han mostrado diferencias claras entre los ratones BAMBI^{-/-} y BAMBI^{+/+}.

En conclusión, en el presente trabajo de Tesis demostramos que BAMBI forma parte de un sensor molecular que determina la intensidad de la señalización por TGFβ en los linfocitos T-CD4⁺. Aunque no ha sido analizado en el presente estudio, este sensor molecular probablemente actúe también en otras poblaciones inmunocompetentes linfoides (T-CD8⁺, células B) o no linfoides donde TGFβ desempeñe sus actividades funcionales. En los linfocitos T-CD4⁺, BAMBI a través de este sensor molecular, regula los procesos de diferenciación funcional de esta población celular al menos a los subtipos Treg y Th17. Este efecto acarrea consecuencias importantes para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Por ello, nuestros resultados se suman al de trabajos recientes que atribuyen a BAMBI un papel crucial en la patogénesis de enfermedades asociadas a inflamación (Drömann *et al.*, 2010; Sekiya *et al.*, 2004; Fritzmann *et al.*, 2009), apuntando hacia un papel de BAMBI en el control de la intensidad de la señalización por TGFβ en distintos órganos y patologías. Por último aportamos una nueva posibilidad para influir en la biología de las subpoblaciones de linfocitos T-CD4⁺, identificando a BAMBI como una nueva diana terapéutica en autoinmunidad e inflamación.

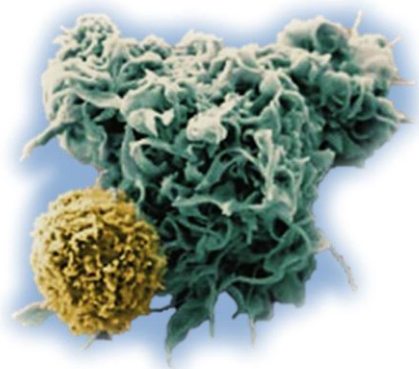
VI.CONCLUSIONES



VI. CONCLUSIONES

- 1.- El pseudoreceptor BAMBI se expresa en timo y bazo y es inducible por TGF β en linfocitos T-CD4⁺ activados.
- 2.- La ausencia de BAMBI aumenta la señalización canónica a través de la fosforilación de Smad3 en linfocitos T-CD4⁺ tras estimulación con TGF β .
- 3.- BAMBI es un regulador de la diferenciación y funcionalidad de los linfocitos Tregs. Así, la ausencia de BAMBI se asocia con alteraciones homeostáticas en las poblaciones de células Tregs *in vivo*, con un incremento en la diferenciación *in vitro* de Tregs a partir de linfocitos T-CD4⁺ *naïve* y con una potenciación en su actividad supresora.
- 4.- Las células T-reguladoras deficientes en BAMBI muestran una señalización por la IL-2 aumentada, asociada a un incremento en su expresión de CD25.
- 5.- Los linfocitos T-CD4⁺ *naïve* deficientes en BAMBI muestran una menor diferenciación *in vitro* a células Th17. Esta deficiencia en la inducción de linfocitos Th17 también se observa *in vivo* en el contexto de una respuesta inmune autorreactiva.
- 6.- La ausencia de BAMBI protege frente al desarrollo de artritis inducida por colágeno (CIA). Esta protección es dependiente de las células Tregs y de TGF β .
- 7.- Mostramos que BAMBI actúa como un sensor molecular modulando la señalización por TGF β en linfocitos T-CD4⁺. Este sensor molecular influencia la diferenciación funcional de estas células afectando al desarrollo de patologías autoinmunes. En este sentido, planteamos que BAMBI constituye una nueva diana molecular en patologías inflamatorias.

VII. BIBLIOGRAFÍA



VII. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Rodriguez, EV, G Napolitani, A Lanzavecchia and F Sallusto, 2007. **Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.** *Nat Immunol* 8(9): 942-9.

Afkarian, M, JR Sedy, J Yang, NG Jacobson, N Cereb, SY Yang, TL Murphy and KM Murphy, 2002. **T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4 $^{+}$ T cells.** *Nat Immunol* 3(6): 549-57.

Agius PE, Piccolo S, De Robertis EM. 1999. **The head inducer Cerberus in a multivalent extracellular inhibitor.** *J Soc Biol.* ;193(4-5):347-54.

Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. 2011. **Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation.** *PLoS One.*;6(8):e24226. doi: 10.1371/journal.pone.0024226.

Aleman-Muench GR, Mendoza V, Stenvers K, Garcia-Zepeda EA, Lopez-Casillas F, Raman C, Soldevila G. 2012. **Betaglycan (T β RIII) is expressed in the thymus and regulates T cell development by protecting thymocytes from apoptosis.** *PLoS One.*;7(8):e44217. doi: 10.1371/journal.pone.0044217.

Annunziato, F, L Cosmi, V Santarlasci, L Maggi, F Liotta, B Mazzinghi, E Parente, L Fili, S Ferri, F Frosali, F Giudici, P Romagnani, P Parronchi, F Tonelli, E Maggi and S Romagnani, 2007. **Phenotypic and functional features of human Th17 cells.** *J Exp Med* 204(8): 1849-61.

Apostolou, I, A Sarukhan, L Klein and H von Boehmer, 2002. **Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen.** *Nat Immunol* 3(8): 756-63.

Apostolou, I and H von Boehmer, 2004. **In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells.** *J Exp Med* 199(10): 1401-8.

Aranami, T and T Yamamura, 2008. **Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS).** *Allergol Int* 57(2): 115-20.

Annes, J. P., Munger, J. S. and Rifkin, D. B. (2003). **Making Sense of Latent TGF β Activation.** *J. Cell. Sci.* **116**, 217-224.

Attisano, L., y Wrana, J. L. (2002). **Signal transduction by the TGF- β superfamily.** *Science*, 296(5573), 1646-7.

Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL, 1993. **Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors.** *Cell. Nov* 19;75(4):671-80.

Bacchetta, R, C Sartirana, MK Levings, C Bordinon, S Narula and MG Roncarolo, 2002. **Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines.** *Eur J Immunol* 32(8): 2237-45.

Barcellos-Hoff, M. H. and Dix, T. A. (1996). **Redox-Mediated Activation of Latent Transforming Growth Factor-Beta 1.** *Mol. Endocrinol.* **10**, 1077-1083.

Barrett, NA and KF Austen, 2009. **Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation.** *Immunity* 31(3): 425-37.

Bartel DP.2004. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell.* Jan 23;116(2):281-97.

Battaglia, M, S Gregori, R Bacchetta and MG Roncarolo, 2006. **Tr1 cells: from discovery to their clinical application.** *Semin Immunol* 18(2): 120-7.

Batten, M, N Ramamoorthi, NM Kljavin, CS Ma, JH Cox, HS Dengler, DM Danilenko, P Caplazi, M Wong, DA Fulcher, MC Cook, C King, SG Tangye, FJ de Sauvage and N Ghilardi, 2010. **IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells.** *J Exp Med* 207(13): 2895-906.

Bayer, AL, A Yu, D Adeegbe and TR Malek, 2005. **Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period.** *J Exp Med* 201(5): 769-77.

Bending, D, H De la Pena, M Veldhoen, JM Phillips, C Uyttenhove, B Stockinger and A Cooke, 2009. **Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice.** *J Clin Invest* 119(3): 565-72.

Bennett, CL, J Christie, F Ramsdell, ME Brunkow, PJ Ferguson, L Whitesell, TE Kelly, FT Saulsbury, PF Chance and HD Ochs, 2001. **The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.** *Nat Genet* 27(1): 20-1.

Bettelli, E, Y Carrier, W Gao, T Korn, TB Strom, M Oukka, HL Weiner and VK Kuchroo, 2006. **Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.** *Nature* 441(7090): 235-8.

Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. 2005. **Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 5;102(14):5138-43.

Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L. and Moses, H. L. (2001). **Transforming Growth Factor-beta1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-Dependent Mechanism.** *Mol. Biol. Cell* **12**, 27-36.

Birkenfeld P, Haratz N, Klein G, Sulitzeanu D. 1990. **Cross-reactivity between the EBNA-1 p107 peptide, collagen, and keratin: implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Clin Immunol Immunopathol.* Jan;54(1):14-25.

Birkey Reffey S, Wurthner JU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS. 2001. **X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling.** *J Biol Chem.* Jul 13;276(28):26542-9.

Biswas PS, Gupta S, Chang E, Song L, Stirzaker RA, Liao JK, Bhagat G, Pernis AB. 2010. **Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice.** *J Clin Invest. Sep*;120(9):3280-95. doi: 10.1172/JCI42856.

Bleul CC, Boehm T. 2005. **BMP signaling is required for normal thymus development.** *J Immunol. Oct* 15;175(8):5213-21.

Bogdan C, Gessner A, Rölinghoff M. 1993. **Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions.** *Immunobiology. Nov*;189(3-4):356-96.

Borsellino, G, M Kleinewietfeld, D Di Mitri, A Sternjak, A Diamantini, R Giometto, S Hopner, D Centonze, G Bernardi, ML Dell'Acqua, PM Rossini, L Battistini, O Rotzschke and K Falk, 2007. **Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression.** *Blood* 110(4): 1225-32.

Boyman O, Surh CD, Sprent J. 2006. **Potential use of IL-2/anti-IL-2 antibody immune complexes for the treatment of cancer and autoimmune disease.** *Expert Opin Biol Ther. Dec*;6(12):1323-31.

Boyman O, Cho JH, Sprent J. 2010. **The role of interleukin-2 in memory CD8 cell differentiation.** *Adv Exp Med Biol.*;684:28-41.

Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E.1993. **Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site.** *Mol Cell Biol. Feb*;13(2):1155-62.

Brand, DD, AH Kang and EF Rosloniec, 2003. **Immunopathogenesis of collagen arthritis.** *Springer Semin Immunopathol* 25(1): 3-18.

Brunkow, ME, EW Jeffery, KA Hjerrild, B Paeper, LB Clark, SA Yasayko, JE Wilkinson, D Galas, SF Ziegler and F Ramsdell, 2001. **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** *Nat Genet* 27(1): 68-73.

Brusko, TM, AL Putnam and JA Bluestone, 2008. **Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities.** *Immunol Rev* 223: 371-90.

Brustle, A, S Heink, M Huber, C Rosenplanter, C Stadelmann, P Yu, E Arpaia, TW Mak, T Kamradt and M Lohoff, 2007. **The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4.** *Nat Immunol* 8(9): 958-66.

Burchill, MA, J Yang, C Vogtenhuber, BR Blazar and MA Farrar, 2007. **IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells.** *J Immunol* 178(1): 280-90.

Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A; EPISER Study Group.2002. **The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain.** *Rheumatology (Oxford). Jan*;41(1):88-95.

- Cazac, BB and J Roes, 2000. **TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo.** *Immunity* 13(4): 443-51.
- Cobb, B. S., S. T. Smale. 2005. **Ikaros-family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 290: 29–47).
- Coffey RJ Jr, Bascom CC, Sipes NJ, Graves-Deal R, Weissman BE, Moses HL. 1988. **Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta.** *Mol Cell Biol. Aug;8(8):3088-93.*
- Coffman, RL, BW Seymour, S Hudak, J Jackson and D Rennick, 1989. **Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice.** *Science* 245(4915): 308-10.
- Collison, LW, CJ Workman, TT Kuo, K Boyd, Y Wang, KM Vignali, R Cross, D Sehy, RS Blumberg and DA Vignali, 2007. **The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function.** *Nature* 450(7169): 566-9.
- Conery, A. R., Cao, Y., Thompson, E. A., Townsend, C. M., Jr, Ko, T. C. and Luo, K. 2004. **Akt Interacts Directly with Smad3 to Regulate the Sensitivity to TGF-Beta Induced Apoptosis.** *Nat. Cell Biol.* 6, 366-372.
- Coombes, JL, KR Siddiqui, CV Arancibia-Carcamo, J Hall, CM Sun, Y Belkaid and F Powrie, 2007. **A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism.** *J Exp Med* 204(8): 1757-64.
- Corthay, A, 2009. **How do regulatory T cells work?** *Scand J Immunol* 70(4): 326-36.
- Courtenay, JS, MJ Dallman, AD Dayan, A Martin and B Mosedale, 1980. **Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice.** *Nature* 283(5748): 666-8.
- Cote-Sierra J, Foucras G, Guo L, Chiodetti L, Young HA, Hu-Li J, Zhu J, Paul WE. 2004. **Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A. Mar 16;101(11):3880-5.*
- Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J. E., Ribeiro, S. M., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P. and Bouck, N. (1998). **Thrombospondin-1 is a Major Activator of TGF-beta1 in Vivo.** *Cell* 93, 1159-1170.
- Crowley M, Inaba K, Witmer-Pack M, Steinman RM. 1989. **The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus.** *Cell Immunol. Jan;118(1):108-25.*
- Cua, DJ, J Sherlock, Y Chen, CA Murphy, B Joyce, B Seymour, L Lucian, W To, S Kwan, T Churakova, S Zurawski, M Wiekowski, SA Lira, D Gorman, RA Kastelein and JD Sedgwick, 2003. **Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain.** *Nature* 421(6924): 744-8.

Curotto de Lafaille, MA, N Kutchukhidze, S Shen, Y Ding, H Yee and JJ Lafaille, 2008. **Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation.** *Immunity* 29(1): 114-26.

Curotto de Lafaille, MA and JJ Lafaille, 2009. **Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?** *Immunity* 30(5): 626-35.

Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM. 2000. **JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome.** *J Clin Invest. Dec;106(12):R75-81.*

Chen, R. H., Su, Y. H., Chuang, R. L. and Chang, T. Y. (1998). **Suppression of Transforming Growth Factor-Beta-Induced Apoptosis through a Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-Dependent Pathway.** *Oncogene* 17, 1959-1968.

Chen, Y. G., Liu, F. and Massague, J. (1997). **Mechanism of TGFbeta Receptor Inhibition by FKBP12.** *EMBO J.* 16, 3866-3876.

Chen, J., Bush, J. O., Ovitt, C. E., Lan, Y., y Jiang, R. (2007). **The TGF-beta pseudoreceptor gene Bambi is dispensable for mouse embryonic development and postnatal survival.** *Genesis*, 45(8), 482-6.

Chen, Y., Bhushan, A., y Vale, W. (1997). **Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 [corrected] receptor serine kinase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 12938-43.

Chen, W, W Jin, N Hardegen, KJ Lei, L Li, N Marinos, G McGrady and SM Wahl, 2003. **Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3.** *J Exp Med* 198(12): 1875-86.

Chen, W, W Jin and SM Wahl, 1998. **Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells.** *J Exp Med* 188(10): 1849-57.

Chen, Y, VK Kuchroo, J Inobe, DA Hafler and HL Weiner, 1994. **Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.** *Science* 265(5176): 1237-40.

Chen, Z, A Laurence, Y Kanno, M Pacher-Zavisin, BM Zhu, C Tato, A Yoshimura, L Hennighausen and JJ O'Shea, 2006. **Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(21): 8137-42

Cho, YG, ML Cho, SY Min and HY Kim, 2007. **Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev* 7(1): 65-70.

Dardalhon, V, A Awasthi, H Kwon, G Galileos, W Gao, RA Sobel, M Mitsdoerffer, TB Strom, W Elyaman, IC Ho, S Khoury, M Oukka and VK Kuchroo, 2008. **IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells.** *Nat Immunol* 9(12): 1347-55.

Datta, P. K., Chytil, A., Gorska, A. E. and Moses, H. L. (1998). **Identification of STRAP, a Novel WD Domain Protein in Transforming Growth Factor-Beta Signaling.** *J. Biol. Chem.* **273**, 34671-34674.

Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. 1995. **Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 6;92(12):5545-9.

Davies, M., Robinson, M., Smith, E., Huntley, S., Prime, S. and Paterson, I. (2005). **Induction of an Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Immortal and Malignant Keratinocytes by TGF-beta1 Involves MAPK, Smad and AP-1 Signalling Pathways.** *J. Cell. Biochem.* **95**, 918-931.

Davidson, NJ, MW Leach, MM Fort, L Thompson-Snipes, R Kuhn, W Muller, DJ Berg and DM Rennick, 1996. **T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice.** *J Exp Med* 184(1): 241-51.

Davidson, TS, RJ DiPaolo, J Andersson and EM Shevach, 2007. **Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells.** *J Immunol* 178(7): 4022-6.

D'Cruz LM, Klein L. 2005. **Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling.** *Nat Immunol.* Nov;6(11):1152-9.

Del Prete, GF, M De Carli, C Mastromauro, R Biagiotti, D Macchia, P Falagiani, M Ricci and S Romagnani, 1991. **Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production.** *J Clin Invest* 88(1): 346-50.

Derynck, R. and Akhurst, R. J. (2007). **Differentiation Plasticity Regulated by TGF-Beta Family Proteins in Development and Disease.** *Nat. Cell Biol.* **9**, 1000-1004.

Derynck, R., y Zhang, Y. E. (2003). **Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.** *Nature*, 425(6958), 577-84.

Derynck, R., Zhang, Y., y Feng, X. H. (1998). **Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses.** *Cell*, 95(6), 737-40.

Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. and Wrana, J. L. (2003). **Distinct Endocytic Pathways Regulate TGF-Beta Receptor Signalling and Turnover.** *Nat. Cell Biol.* **5**, 410-421.

Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S. and Akhurst, R. J. (1995). **Defective Haematopoiesis and Vasculogenesis in Transforming Growth Factor-Beta 1 Knock Out Mice.** *Development* 121, 1845-1854.

Dobaczewski, M., Chen, W., y Frangogiannis, N. G. (2011). **Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling.** *Journal of molecular and cellular cardiology*, 51(4), 600-6.

Doetze, A, J Satoguina, G Burchard, T Rau, C Loliger, B Fleischer and A Hoerauf, 2000. **Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type**

cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol* 12(5): 623-30.

Drews, F., Knobel, S., Moser, M., Muhlack, K. G., Mohren, S., Stoll, C., Bosio, A., Gressner, A. M. and Weiskirchen, R. (2008). **Disruption of the Latent Transforming Growth Factor-Beta Binding Protein-1 Gene Causes Alteration in Facial Structure and Influences TGF-Beta Bioavailability.** *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 34-48.

Drömann D, Rupp J, Rohmann K, Osbahr S, Ulmer AJ, Marwitz S, Röschmann K, Abdullah M, Schultz H, Vollmer E, Zabel P, Dalhoff K, Goldmann T. 2010. **The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable Haemophilus influenzae.** *Respir Res.* May 31;11:67. doi: 10.1186/1465-9921-11-67.

Du, J, C Huang, B Zhou and SF Ziegler, 2008. **Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3.** *J Immunol* 180(7): 4785-92.

Duarte, JH, S Zelenay, ML Bergman, AC Martins and J Demengeot, 2009. **Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions.** *Eur J Immunol* 39(4): 948-55.

Edlund S, Bu S, Schuster N, Aspenström P, Heuchel R, Heldin NE, ten Dijke P, Heldin CH, Landström M. 2003. **Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3.** *Mol Biol Cell.* Feb;14(2):529-44.

Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K., y Moses, H. L. (1999). **Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription.** *The Journal of biological chemistry*, 274(52), 37413-20.

Faulkner, H, JC Renauld, J Van Snick and RK Grencis, 1998. **Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode Trichuris muris.** *Infect Immun* 66(8): 3832-40.

Fazilleau, N, LJ McHeyzer-Williams, H Rosen and MG McHeyzer-Williams, 2009. **The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding.** *Nat Immunol* 10(4): 375-84.

Feau S, Arens R, Togher S, Schoenberger SP. 2011. **Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells.** *Nat Immunol.* Jul 31;12(9):908-13. doi: 10.1038/ni.2079.

Felici, A., Wurthner, J. U., Parks, W. T., Giam, L. R., Reiss, M., Karpova, T. S., McNally, J. G. and Roberts, A. B. 2003. **TLP, a Novel Modulator of TGF-Beta Signaling, has Opposite Effects on Smad2- and Smad3-Dependent Signaling.** *EMBO J.* 22, 4465-4477.

Ferber, IA, S Brocke, C Taylor-Edwards, W Ridgway, C Dinisco, L Steinman, D Dalton and CG Fathman, 1996. **Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).** *J Immunol* 156(1): 5-7.

Floess, S, J Freyer, C Siewert, U Baron, S Olek, J Polansky, K Schlawe, HD Chang, T Bopp, E Schmitt, S Klein-Hessling, E Serfling, A Hamann and J Huehn, 2007. **Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells.** *PLoS Biol* 5(2): e38.

Fontenot, JD, MA Gavin and AY Rudensky, 2003. **Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.** *Nat Immunol* 4(4): 330-6.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. 2005. **A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells.** *Nat Immunol.* Nov;6(11):1142-51.

Fritzmann, J., Morkel, M., Besser, D., Budczies, J., Kosel, F., Brembeck, F. H., Stein, U., Fichtner, I., Schlag, P. M., y Birchmeier, W. (2009). **A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential.** *Gastroenterology*, 137(1), 165-75.

Furtado, GC, MA Curotto de Lafaille, N Kutchukhidze and JJ Lafaille, 2002. **Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function.** *J Exp Med* 196(6): 851-7.

Gao, L., Joberty, G. and Macara, I. G. 2002. **Assembly of Epithelial Tight Junctions is Negatively Regulated by Par6.** *Curr. Biol.* **12**, 221-225.

Garin, MI, CC Chu, D Golshayan, E Cernuda-Morollon, R Wait and RI Lechler, 2007. **Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells.** *Blood* 109(5): 2058-65.

Gavin, MA, JP Rasmussen, JD Fontenot, V Vasta, VC Manganiello, JA Beavo and AY Rudensky, 2007. **Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation.** *Nature* 445(7129): 771-5.

Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renauld JC, Matthys P. 2009. **Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice.** *Arthritis Rheum.* Feb;60(2):390-5. doi: 10.1002/art.24220.

Gershon, RK and K Kondo, 1970. **Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.** *Immunology* 18(5): 723-37.

Gil-Guerrero, L, J Dotor, IL Huibregtse, N Casares, AB Lopez-Vazquez, F Rudilla, JI Riezu-Boj, J Lopez-Sagaseta, J Hermida, S Van Deventer, J Bezunartea, D Llopiz, P Sarobe, J Prieto, F Borrás-Cuesta and JJ Lasarte, 2008. **In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1.** *J Immunol* 181(1): 126-35.

Gleizes, P. E., Beavis, R. C., Mazzieri, R., Shen, B. and Rifkin, D. B. 1996. **Identification and Characterization of an Eight-Cysteine Repeat of the Latent Transforming Growth Factor-Beta Binding Protein-1 that Mediates Bonding to the Latent Transforming Growth Factor-beta1.** *J. Biol. Chem.* **271**, 29891-29896.

Gomis RR, Alarcón C, He W, Wang Q, Seoane J, Lash A, Massagué J. 2006. **A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 22;103(34):12747-52.

- Gondek, DC, LF Lu, SA Quezada, S Sakaguchi and RJ Noelle, 2005. **Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.** *J Immunol* 174(4): 1783-6.
- Gonzalez-Rey, E, A Fernandez-Martin, A Chorny and M Delgado, 2006. **Vasoactive intestinal peptide induces CD4+,CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 54(3): 864-76.
- Gonzalez, J, E Tamayo, I Santiuste, R Marquina, L Buelta, MA Gonzalez-Gay, S Izui, M Lopez-Hoyos, J Merino and R Merino, 2007. **CD4+CD25+ T cell-dependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes.** *J Immunol* 178(5): 2778-86.
- Gorham JD, Güler ML, Fenoglio D, Gubler U, Murphy KM. 1998. **Low dose TGF-beta attenuates IL-12 responsiveness in murine Th cells.** *J Immunol. Aug 15;161(4):1664-70.*
- Gorelik, L, S Constant and RA Flavell, 2002. **Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation.** *J Exp Med* 195(11): 1499-505.
- Gorelik, L, PE Fields and RA Flavell, 2000. **Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression.** *J Immunol* 165(9): 4773-7.
- Gorelik L, Flavell RA. 2000. **Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease.** *Immunity. Feb;12(2):171-81.*
- Goumans MJ, Mummery C. 2000. **Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice.** *Int J Dev Biol. Apr;44(3):253-65.*
- Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A.2002. **IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination.** *J Immunol. Dec 15;169(12):7104-10.*
- Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, Rescigno M, Moro G, Ricciardi-Castagnoli P. 2001. **Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis.** *Nat Immunol. Sep;2(9):882-8.*
- Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli P. 2003. **Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity.** *EMBO J. Jun 2;22(11):2546-51.*
- Grossman, WJ, JW Verbsky, W Barchet, M Colonna, JP Atkinson and TJ Ley, 2004. **Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death.** *Immunity* 21(4): 589-601.
- Groux, H, 2003. **Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses.** *Transplantation* 75(9 Suppl): 8S-12S.

- Groux, H, A O'Garra, M Bigler, M Rouleau, S Antonenko, JE de Vries and MG Roncarolo, 1997. **A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.** *Nature* 389(6652): 737-42.
- Grotewold L, Plum M, Dildrop R, Peters T, Rüther U. 2001. **Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis.** *Mech Dev. Feb;100(2):327-30.*
- Gruber BL, Marchese MJ, Kew RR. 1994. **Transforming growth factor- β 1 mediates mast cell chemotaxis.** *J. Immunol.* 152:5860–67
- Guillot N, Kollins D, Gilbert V, Xavier S, Chen J, Gentle M, Reddy A, Bottinger E, Jiang R, Rastaldi MP, Corbelli A, Schlondorff D. 2012. **BAMBI regulates angiogenesis and endothelial homeostasis through modulation of alternative TGF β signaling.** *PLoS One.* 7(6):e39406.
- Hahm, K, BS Cobb, AS McCarty, KE Brown, CA Klug, R Lee, K Akashi, IL Weissman, AG Fisher and ST Smale, 1998. **Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin.** *Genes Dev* 12(6): 782-96.
- Hammaker D, Sweeney S, Firestein GS. 2003. **Signal transduction networks in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis.* Nov;62 Suppl 2:ii86-9.
- Hannon GJ, Beach D. 1994. **p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest.** *Nature.* Sep 15;371(6494):257-61.
- Harada, K., Sato, Y., Ikeda, H., Isse, K., Ozaki, S., Enomae, M., Ohama, K., Katayanagi, K., Kurumaya, H., Matsui, A., y Nakanuma, Y. 2009. **Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia.** *J Pathol*, 217(5), 654-64.
- Harrington, LE, RD Hatton, PR Mangan, H Turner, TL Murphy, KM Murphy and CT Weaver, 2005. **Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.** *Nat Immunol* 6(11): 1123-32.
- Hawrylowicz, CM and A O'Garra, 2005. **Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma.** *Nat Rev Immunol* 5(4): 271-83.
- Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. 2008. **The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells.** *J Exp Med.* Mar 17;205(3):565-74. doi: 10.1084/jem.20071477.
- Haynes, NM, CD Allen, R Lesley, KM Ansel, N Killeen and JG Cyster, 2007. **Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation.** *J Immunol* 179(8): 5099-108.
- Heger, J., Peters, S. C., Piper, H. M., y Euler, G. 2009. **SMAD-proteins as a molecular switch from hypertrophy to apoptosis induction in adult ventricular cardiomyocytes.** *Journal of cellular physiology*, 220(2), 515-23.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., y ten Dijke, P. 1997. **TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.** *Nature*, 390(6659), 465-71.

- Higashihori N, Song Y, Richman JM. 2008. **Expression and regulation of the decoy bone morphogenetic protein receptor BAMBI in the developing avian face.** *Dev Dyn.* May;237(5):1500-8. doi: 10.1002/dvdy.21529.
- Ho, IC, MR Hodge, JW Rooney and LH Glimcher, 1996. **The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4.** *Cell* 85(7): 973-83.
- Hori, S, 2010. **Developmental plasticity of Foxp3+ regulatory T cells.** *Curr Opin Immunol* 22(5): 575-82.
- Hori, S, T Nomura and S Sakaguchi, 2003. **Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.** *Science* 299(5609): 1057-61.
- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. 1993. **Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.** *Science.* Apr 23;260(5107):547-9.
- Hu H, Djuretic I, Sundrud MS, Rao A. 2007. **Transcriptional partners in regulatory T cells: Foxp3, Runx and NFAT.** *Trends Immunol.* Aug;28(8):329-32.
- Hu, HZ, GL Li, YK Lim, SH Chan and EH Yap, 1999. **Kinetics of interferon-gamma secretion and its regulatory factors in the early phase of acute graft-versus-host disease.** *Immunology* 98(3): 379-85.
- Huber, S, C Schramm, HA Lehr, A Mann, S Schmitt, C Becker, M Protschka, PR Galle, MF Neurath and M Blessing, 2004. **Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells.** *J Immunol* 173(11): 6526-31.
- Huizinga TW, Linn-Rasker S, Lard LR, Westendorp RG. 2002. **Genetic drift as an explanation for the reduced incidence of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum.* Nov;46(11):3107.
- Huse, M., Chen, Y. G., Massague, J. and Kuriyan, J. 1999. **Crystal Structure of the Cytoplasmic Domain of the Type I TGF Beta Receptor in Complex with FKBP12.** *Cell* 96, 425-436.
- Huse, M., Muir, T. W., Xu, L., Chen, Y. G., Kuriyan, J. and Massague, J. 2001. **The TGF Beta Receptor Activation Process: An Inhibitor- to Substrate-Binding Switch.** *Mol. Cell* 8, 671-682.
- Hutloff A, Büchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A, Dörner T, Kroczeck RA. 2004. **Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum.* Oct;50(10):3211-20.
- Hynes, R. O. 2004. **The Emergence of Integrins: A Personal and Historical Perspective.** *Matrix Biol.* 23, 333-340.
- Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, Chinen T, Saeki K, Nakaya M, Takaesu G, Hori S, Yoshimura A, Kobayashi T. 2008. **Foxp3 inhibits RORgammat-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORgammat.** *J Biol Chem.* Jun 20;283(25):17003-8. doi: 10.1074/jbc.M801286200.

Iemura S, Yamamoto TS, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, Sugino H, Ueno N. 1998. **Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 4;95(16):9337-42.

Iglesias M, Postigo J, Santiuste I, González J, Buelta L, Tamayo E, Merino J, Merino R. 2012. **p27(kip1) inhibits systemic autoimmunity through the control of regulatory T cell activity and differentiation.** *Arthritis Rheum.* Nov 2. doi: 10.1002/art.37778.

Inui M, Martello G, Piccolo S. 2010. **MicroRNA control of signal transduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* Apr;11(4):252-63. doi: 10.1038/nrm2868.

Itoh, S. and ten Dijke, P. 2007. **Negative Regulation of TGF-Beta receptor/Smad Signal Transduction.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 176-184.

Ivanov, II, BS McKenzie, L Zhou, CE Tadokoro, A Lepelley, JJ Lafaille, DJ Cua and DR Littman, 2006. **The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.** *Cell* 126(6): 1121-33.

Ivanov, II, L Zhou and DR Littman, 2007. **Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation.** *Semin Immunol* 19(6): 409-17.

Jaffe, A. B. and Hall, A. 2005. **Rho GTPases: Biochemistry and Biology.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 247-269.

Jana, S, P Jailwala, D Haribhai, J Waukau, S Glisic, W Grossman, M Mishra, R Wen, D Wang, CB Williams and S Ghosh, 2009. **The role of NF-kappaB and Smad3 in TGF-beta-mediated Foxp3 expression.** *Eur J Immunol* 39(9): 2571-83.

Javelaud, D., y Mauviel, A. 2004. **Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles.** *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(7), 1161-5.

Johnston, RJ, AC Poholek, D DiToro, I Yusuf, D Eto, B Barnett, AL Dent, J Craft and S Crotty, 2009. **Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation.** *Science* 325(5943): 1006-10

Jordan, MS, A Boesteanu, AJ Reed, AL Petrone, AE Hosenbeck, MA Lerman, A Naji and AJ Caton, 2001. **Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide.** *Nat Immunol* 2(4): 301-6.

Josefowicz, SZ and A Rudensky, 2009. **Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance.** *Immunity* 30(5): 616-25.

Kaartinen, V., Voncken, J. W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N. and Groffen, J. 1995. **Abnormal Lung Development and Cleft Palate in Mice Lacking TGF-Beta 3 Indicates Defects of Epithelial-Mesenchymal Interaction.** *Nat. Genet.* 11, 415-421.

- Kang, J. S., Liu, C., y Derynck, R. 2009. **New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function.** *Trends Cell Biol*, 19(8), 385-94.
- Khatttri, R, T Cox, SA Yasayko and F Ramsdell, 2003. **An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells.** *Nat Immunol* 4(4): 337-42.
- Khin, S. S., Kitazawa, R., Win, N., Aye, T. T., Mori, K., Kondo, T., y Kitazawa, S. 2009. **BAMBI gene is epigenetically silenced in subset of high-grade bladder cancer.** *Int J Cancer*, 125(2), 328-38.
- Kim HP, Leonard WJ. 2007. **CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation.** *J Exp Med.* Jul 9;204(7):1543-51.
- Kim HP, Kim BG, Letterio J, Leonard WJ. 2005. **Smad-dependent cooperative regulation of interleukin 2 receptor alpha chain gene expression by T cell receptor and transforming growth factor-beta.** *J Biol Chem.* Oct 7;280(40):34042-7.
- Kitani, A, K Chua, K Nakamura and W Strober, 2000. **Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells.** *J Immunol* 165(2): 691-702
- Kojima, A and RT Prehn, 1981. **Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice.** *Immunogenetics* 14(1-2): 15-27.
- Koli, K., Saharinen, J., Hyytiainen, M., Penttinen, C. and Keski-Oja, J. 2001. **Latency, Activation, and Binding Proteins of TGF-Beta.** *Microsc. Res. Tech.* 52, 354-362.
- Komatsu, N, ME Mariotti-Ferrandiz, Y Wang, B Malissen, H Waldmann and S Hori, 2009. **Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6): 1903-8.
- Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Köhler G. 1993. **Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses.** *Nature.* Mar 18;362(6417):245-8.
- Korn, T, E Bettelli, W Gao, A Awasthi, A Jager, TB Strom, M Oukka and VK Kuchroo, 2007. **IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells.** *Nature* 448(7152): 484-7.
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. and Massague, J. 1999. **A Mechanism of Repression of TGFbeta/ Smad Signaling by Oncogenic Ras.** *Genes Dev.* 13, 804-816.
- Kretschmer, K, I Apostolou, D Hawiger, K Khazaie, MC Nussenzweig and H von Boehmer, 2005. **Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen.** *Nat Immunol* 6(12): 1219-27.
- Kulkarni, AB, CG Huh, D Becker, A Geiser, M Lyght, KC Flanders, AB Roberts, MB Sporn, JM Ward and S Karlsson, 1993. **Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(2): 770-4.

Laiho M, Weis FM, Boyd FT, Ignatz RA, Massagué J. 1991. **Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II.** *J Biol Chem.* May 15;266(14):9108-12.

Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. 2005. **Transforming growth factor- β controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon- γ .** *Nat. Immunol.* 6:600-7

Larché M, Akdis CA, Valenta R. 2006. **Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy.** *Nat Rev Immunol.* Oct;6(10):761-71.

Laurence, A and JJ O'Shea, 2007. **T(H)-17 differentiation: of mice and men.** *Nat Immunol* 8(9): 903-5.

Laurence, A, CM Tato, TS Davidson, Y Kanno, Z Chen, Z Yao, RB Blank, F Meylan, R Siegel, L Hennighausen, EM Shevach and J O'Shea J, 2007. **Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation.** *Immunity* 26(3): 371-81.

Lebman DA, Edmiston JS. 1999. **The role of TGF- β in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes.** *Microbes Infect.* 1:1297-304

Lee, YK, H Turner, CL Maynard, JR Oliver, D Chen, CO Elson and CT Weaver, 2009. **Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage.** *Immunity* 30(1): 92-107.

Lenardo MJ. 1991. **Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis.** *Nature.* Oct 31;353(6347):858-61.

Leonard WJ. 2001. **Cytokines and immunodeficiency diseases.** *Nat Rev Immunol*; 1:200-8.

Letamendía A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C. 1998. **Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan.** *J Biol Chem.* Dec 4;273(49):33011-9.

Letterio, JJ and AB Roberts, 1998. **Regulation of immune responses by TGF-beta.** *Annu Rev Immunol* 16: 137-61.

Letterio, J. J., Geiser, A. G., Kulkarni, A. B., Dang, H., Kong, L., Nakabayashi, T., Mackall, C. L., Gress, R. E. and Roberts, A. B. (1996). **Autoimmunity Associated with TGF-beta1-Deficiency in Mice is Dependent on MHC Class II Antigen Expression.** *J. Clin. Invest.* 98, 2109-2119.

Leung, BP, IB McInnes, E Esfandiari, XQ Wei and FY Liew, 2000. **Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis.** *J Immunol* 164(12): 6495-502.

Li, L, Y Iwamoto, A Berezovskaya and VA Boussiotis, 2006. **A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27Kip1 and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance.** *Nat Immunol* 7(11): 1157-65.

Li, MO and RA Flavell, 2008. **TGF-beta: a master of all T cell trades.** *Cell* 134(3): 392-404.

Li, MO, YY Wan and RA Flavell, 2007. **T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation.** *Immunity* 26(5): 579-91.

Liang, B, C Workman, J Lee, C Chew, BM Dale, L Colonna, M Flores, N Li, E Schweighoffer, S Greenberg, V Tybulewicz, D Vignali and R Clynes, 2008. **Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II.** *J Immunol* 180(9): 5916-26.

Liao W, Lin JX, Leonard WJ. 2011. **IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation.** *Curr Opin Immunol.* Oct;23(5):598-604. doi: 10.1016/j.coi.2011.08.003.

Liao W, Lin JX, Leonard WJ. 2013. **IL-2 at the Crossroads of Effector responses, Tolerance and Immunotherapy.** *Immunity* 38(1):01.004.

Licona-Limón P, Soldevila G. 2007. **The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights.** *Immunol Lett.* Mar 15;109(1):1-12.

Lim, HW and CH Kim, 2007. **Loss of IL-7 receptor alpha on CD4+ T cells defines terminally differentiated B cell-helping effector T cells in a B cell-rich lymphoid tissue.** *J Immunol* 179(11): 7448-56.

Lin JX, Leonard WJ. 1997. **Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997 Dec;8(4):313-32.

Lin Z, Gao C, Ning Y, He X, Wu W, Chen YG. 2008. **The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling.** *J Biol Chem.* Nov 28;283(48):33053-8. doi: 10.1074/jbc.M804039200.

Lio CW, Hsieh CS. 2008. **A two-step process for thymic regulatory T cell development.** *Immunity.* Jan;28(1):100-11. doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.021.

Littman DR, Rudensky AY. 2010. **Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation.** *Cell.* Mar 19;140(6):845-58. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.021.

Liu, Y, P Zhang, J Li, AB Kulkarni, S Perruche and W Chen, 2008. **A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells.** *Nat Immunol* 9(6): 632-40.

Longphre, M, D Li, M Gallup, E Drori, CL Ordonez, T Redman, S Wenzel, DE Bice, JV Fahy and C Basbaum, 1999. **Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells.** *J Clin Invest* 104(10): 1375-82.

Lu, L, J Wang, F Zhang, Y Chai, D Brand, X Wang, DA Horwitz, W Shi and SG Zheng, 2010. **Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells.** *J Immunol* 184(8): 4295-306.

Lubberts, E, MI Koenders, B Oppers-Walgreen, L van den Bersselaar, CJ Coenen-de Roo, LA Joosten and WB van den Berg, 2004. **Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after**

the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50(2): 650-9

Lucas PJ, Kim SJ, Melby SJ, Gress RE. 2000. **Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor.** *J Exp Med.* Apr 3;191(7):1187-96.

Lyons, R. M., Keski-Oja, J. and Moses, H. L. 1988. **Proteolytic Activation of Latent Transforming Growth Factor-Beta from Fibroblast-Conditioned Medium.** *J. Cell Biol.* 106, 1659-1665.

Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., y Wrana, J. L. (1996). **MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling.** *Cell*, 87(7), 1215-24.

Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL. 2008. **IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis.** *J Clin Immunol.* Nov;28(6):635-9. doi: 10.1007/s10875-008-9235-y.

Malek TR, Castro I. 2010. **Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity.** *Immunity.* Aug 27;33(2):153-65. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004.

Malhotra N, Robertson E, Kang J. 2010. **SMAD2 is essential for TGF beta-mediated Th17 cell generation.** *J Biol Chem.* Sep 17;285(38):29044-8. doi: 10.1074/jbc.C110.156745.

Manel, N, D Unutmaz and DR Littman, 2008. **The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat.** *Nat Immunol* 9(6): 641-9.

Mangan, PR, LE Harrington, DB O'Quinn, WS Helms, DC Bullard, CO Elson, RD Hatton, SM Wahl, TR Schoeb and CT Weaver, 2006. **Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.** *Nature* 441(7090): 231-4.

Manning, G, Whyte D.B, Martinez R, Hunter T and Sudarsanam S., 2002. **The protein kinase complement of the human genome.** *Science* 298, 1912-1934.

Manoury-Schwartz, B, G Chiocchia, N Bessis, O Abehsira-Amar, F Batteux, S Muller, S Huang, MC Boissier and C Fournier, 1997. **High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors.** *J Immunol* 158(11): 5501-6.

Mantel PY, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K, Schmidt-Weber CB. 2006. **Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells.** *J Immunol.* Mar 15;176(6):3593-602.

Marie J.C., D. Liggitt, A.Y. Rudensky. 2006. **Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor.** *Immunity*, 25, pp. 441–454.

- Marks BR, Nowyhed HN, Choi JY, Poholek AC, Odegard JM, Flavell RA, Craft J. 2009. **Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation.** *Nat Immunol.* Oct;10(10):1125-32. doi: 10.1038/ni.1783.
- Marson, A, K Kretschmer, GM Frampton, ES Jacobsen, JK Polansky, KD MacIsaac, SS Levine, E Fraenkel, H von Boehmer and RA Young, 2007. **Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation.** *Nature* 445(7130): 931-5.
- Martinez GJ, Zhang Z, Reynolds JM, Tanaka S, Chung Y, Liu T, Robertson E, Lin X, Feng XH, Dong C. 2010. **Smad2 positively regulates the generation of Th17 cells.** *J Biol Chem.* Sep 17;285(38):29039-43. doi: 10.1074/jbc.C110.155820.
- Martins GA, Cimmino L, Liao J, Magnusdottir E, Calame K. 2008. **Blimp-1 directly represses IL2 and the IL2 activator Fos, attenuating T cell proliferation and survival.** *J Exp Med.* Sep 1;205(9):1959-65. doi: 10.1084/jem.20080526.
- Massague, J. (1998). **TGF-Beta Signal Transduction.** *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753-791.
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D. (2005). **Smad Transcription Factors.** *Genes Dev.* **19**, 2783-2810.
- Massague, J. and Wotton, D. (2000). **Transcriptional Control by the TGF-beta/Smad Signaling System.** *EMBO J.* **19**, 1745-1754.
- McKarns SC, Schwartz RH, Kaminski NE. 2004. **Smad3 is essential for TGF-beta 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation.** *J Immunol.* Apr 1;172(7):4275-84.
- McKay, M. M. and Morrison, D. K. (2007). **Integrating Signals from RTKs to ERK/MAPK.** *Oncogene* **26**, 3113-3121.
- McKenzie, BS, RA Kastelein and DJ Cua, 2006. **Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway.** *Trends Immunol* 27(1): 17-23.
- Mellor, AL, P Chandler, B Baban, AM Hansen, B Marshall, J Pihkala, H Waldmann, S Cobbold, E Adams and DH Munn, 2004. **Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase.** *Int Immunol* 16(10): 1391-401.
- Mingari MC, Gerosa F, Carra G, Accolla RS, Moretta A, Zubler RH, Waldmann TA, Moretta L. 1984. **Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells.** *Nature.* Dec 13-19;312(5995):641-3.
- Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. 2004. **Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells.** *J Immunol.* Apr 15;172(8):4676-80.

Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. 1991. **A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1.** *EMBO J.* May;10(5):1091-101.

Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. 1976. **Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.** *Science.* Sep 10;193(4257):1007-8.

Mosmann, TR, H Cherwinski, MW Bond, MA Giedlin and RL Coffman, 1986. **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *J Immunol* 136(7): 2348-57.

Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., y Heldin, C. H. (2002). **Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation.** *Immunol Lett*, 82(1-2), 85-91.

Moustakas, A., y Heldin, C. H. (2005). **Non-Smad TGF-beta signals.** *J Cell Sci*, 118(Pt 16), 3573-84.

Moustakas, A., y Heldin, C. H. (2009). **The regulation of TGFbeta signal transduction.** *Development*, 136(22), 3699-714.

Moustakas A, Heldin CH. 2003. **Ecsit-ement on the crossroads of Toll and BMP signal transduction.** *Genes Dev.* Dec 1;17(23):2855-9.

Mu Y, Sundar R, Thakur N, Ekman M, Gudey SK, Yakymovych M, Hermansson A, Dimitriou H, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J, Heldin CH, Landström M. 2011. **TRAF6 ubiquitinates TGFβ type I receptor to promote its cleavage and nuclear translocation in cancer.** *Nat Commun.* 2:330. doi: 10.1038/ncomms1332.

Mucida, D, N Kutchukhidze, A Erazo, M Russo, JJ Lafaille and MA Curotto de Lafaille, 2005. **Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs.** *J Clin Invest* 115(7): 1923-33.

Mucida, D, Y Park, G Kim, O Turovskaya, I Scott, M Kronenberg and H Cheroutre, 2007. **Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid.** *Science* 317(5835): 256-60.

Mullen, AC, FA High, AS Hutchins, HW Lee, AV Villarino, DM Livingston, AL Kung, N Cereb, TP Yao, SY Yang and SL Reiner, 2001. **Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection.** *Science* 292(5523): 1907-10.

Munger, JS, JG Harpel, PE Gleizes, R Mazziere, I Nunes and DB Rifkin, 1997. **Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation.** *Kidney Int* 51(5): 1376-82.

Munger, J. S., Harpel, J. G., Giancotti, F. G. and Rifkin, D. B. (1998). **Interactions between Growth Factors and Integrins: Latent Forms of Transforming Growth Factor-Beta are Ligands for the Integrin alphavbeta1.** *Mol. Biol. Cell* 9, 2627-2638.

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. 1999. **The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.** *Cell.* Feb 5;96(3):319-28.

Murphy, CA, CL Langrish, Y Chen, W Blumenschein, T McClanahan, RA Kastelein, JD Sedgwick and DJ Cua, 2003. **Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation.** *J Exp Med* 198(12): 1951-7.

Nakamura, K, A Kitani and W Strober, 2001. **Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.** *J Exp Med* 194(5): 629-44.

Nunes, I., Gleizes, P. E., Metz, C. N. and Rifkin, D. B. (1997). **Latent Transforming Growth Factor-Beta Binding Protein Domains Involved in Activation and Transglutaminase-Dependent Cross-Linking of Latent Transforming Growth Factor-Beta.** *J. Cell Biol.* **136**, 1151-1163.

Nurieva, RI, Y Chung, D Hwang, XO Yang, HS Kang, L Ma, YH Wang, SS Watowich, AM Jetten, Q Tian and C Dong, 2008. **Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages.** *Immunity* 29(1): 138-49.

Nakamura Y, Russell SM, Mess SA, Friedmann M, Erdos M, Francois C, Jacques Y, Adelstein S, Leonard WJ. 1994. **Heterodimerization of the IL-2 receptor beta- and gamma-chain cytoplasmic domains is required for signalling.** *Nature.* May 26;369(6478):330-3.

Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ. 1993. **Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor.** *Science.* Dec 17;262(5141):1877-80.

Nurieva, RI, Y Chung, GJ Martinez, XO Yang, S Tanaka, TD Matskevitch, YH Wang and C Dong, 2009. **Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells.** *Science* 325(5943): 1001-5.

Okazawa, A, T Kanai, M Watanabe, M Yamazaki, N Inoue, M Ikeda, M Kurimoto, H Ishii and T Hibi, 2002. **Th1-mediated intestinal inflammation in Crohn's disease may be induced by activation of lamina propria lymphocytes through synergistic stimulation of interleukin-12 and interleukin-18 without T cell receptor engagement.** *Am J Gastroenterol* 97(12): 3108-17.

Onichtchouk, D., Chen, Y. G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massagué, J., y Niehrs, C. (1999). **Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI.** *Nature*, 401(6752), 480-5.

Oppmann, B, R Lesley, B Blom, JC Timans, Y Xu, B Hunte, F Vega, N Yu, J Wang, K Singh, F Zonin, E Vaisberg, T Churakova, M Liu, D Gorman, J Wagner, S Zurawski, Y Liu, JS Abrams, KW Moore, D Rennick, R de Waal-Malefyt, C Hannum, JF Bazan and RA Kastelein, 2000. **Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12.** *Immunity* 13(5): 715-25.

Ouyang, W, O Beckett, Q Ma and MO Li, 2010. **Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development.** *Immunity* 32(5): 642-53.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H. R., Zhang, Y. and Wrana, J. L. (2005). **Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGFbeta Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity.** *Science* **307**, 1603-1609.

Pandiyan, P, L Zheng, S Ishihara, J Reed and MJ Lenardo, 2007. **CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells.** *Nat Immunol* 8(12): 1353-62.

Paredes R, López Benaldo de Quirós JC, Fernández-Cruz E, Clotet B, Lane HC. 2002. **The potential role of interleukin-2 in patients with HIV infection.** *AIDS Rev. Jan-Mar;4(1):36-40.*

Parish, CR and FY Liew, 1972. **Immune response to chemically modified flagellin. 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin.** *J Exp Med* 135(2): 298-311.

Park, H, Z Li, XO Yang, SH Chang, R Nurieva, YH Wang, Y Wang, L Hood, Z Zhu, Q Tian and C Dong, 2005. **A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.** *Nat Immunol* 6(11): 1133-41.

Parronchi, P, D Macchia, MP Piccinni, P Biswas, C Simonelli, E Maggi, M Ricci, AA Ansari and S Romagnani, 1991. **Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(10): 4538-42.

Pasare C, Medzhitov R. 2003. **Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells.** *Science. Feb 14;299(5609):1033-6.*

Paust, S and H Cantor, 2005. **Regulatory T cells and autoimmune disease.** *Immunol Rev* 204: 195-207.

Piccirillo, CA, JJ Letterio, AM Thornton, RS McHugh, M Mamura, H Mizuhara and EM Shevach, 2002. **CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness.** *J Exp Med* 196(2): 237-246.

Pils D, Wittinger M, Petz M, Gugerell A, Gregor W, Alfanz A, Horvat R, Braicu EI, Sehoul J, Zeillinger R, Mikulits W, Krainer M. 2010. **BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment.** *Gynecol Oncol. May;117(2):189-97. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.12.034.*

Platten, M, S Youssef, EM Hur, PP Ho, MH Han, TV Lanz, LK Phillips, MJ Goldstein, R Bhat, CS Raine, RA Sobel and L Steinman, 2009. **Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(35): 14948-53.

Polyak, K, JY Kato, MJ Solomon, CJ Sherr, J Massague, JM Roberts and A Koff, 1994a. **p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest.** *Genes Dev* 8(1): 9-22.

Proetzel, G., Pawlowski, S. A., Wiles, M. V., Yin, M., Boivin, G. P., Howles, P. N., Ding, J., Ferguson, M. W. and Doetschman, T. (1995). **Transforming Growth Factor-Beta 3 is Required for Secondary Palate Fusion.** *Nat. Genet.* **11**, 409-414.

Rafferty LA, Twombly V, Wharton K, Gelbart WM. 1995. **Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila.** *Genetics. Jan;139(1):241-54.*

- Ramirez, F. and Pereira, L. (1999). **The Fibrillins**. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 255-259.
- Reibman J, Meixler S, Lee TC, Gold LI, Cronstein BN, et al. 1991. **Transforming growth factor β 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6805–9
- Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. 2004. **PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3**. *Nat Cell Biol.* Apr;6(4):358-65.
- Riise T, Jacobsen BK, Gran JT. 2000. **Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in the county of Troms, northern Norway**. *J Rheumatol.* 2000 Jun;27(6):1386-9.
- Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF. 2004. **Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment**. *Clin Exp Immunol.* Jul;137(1):65-73.
- Roncarolo, MG, R Bacchetta, C Bordinon, S Narula and MK Levings, 2001. **Type 1 T regulatory cells**. *Immunol Rev* 182: 68-79.
- Ross, S. and Hill, C. S. (2008). **How the Smads Regulate Transcription**. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 383-408.
- Rosenberg SA. 2001. **Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer**. *J Intern Med.* Dec;250(6):462-75.
- Rosendahl A, Speletas M, Leandersson K, Ivars F, Sideras P. 2003. **Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoeisis**. *Int Immunol.* Dec;15(12):1401-14..
- Rothenberg EV, Ward SB. 1996. **A dynamic assembly of diverse transcription factors integrates activation and cell-type information for interleukin 2 gene regulation**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 3;93(18):9358-65.
- Rubtsov YP, Nieuwehuis RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, Benoist C, Rudensky AY. 2010. **Stability of the regulatory T cell lineage in vivo**. *Science.* Sep 24;329(5999):1667-71.
- Rudensky, AY, 2011. **Regulatory T cells and Foxp3**. *Immunol Rev* 241(1): 260-8.
- Saharinen, J., Taipale, J. and Keski-Oja, J. (1996). **Association of the Small Latent Transforming Growth Factor-Beta with an Eight Cysteine Repeat of its Binding Protein LTBP-1**. *EMBO J.* **15**, 245-253.
- Sakaguchi, S, N Sakaguchi, M Asano, M Itoh and M Toda, 1995. **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases**. *J Immunol* 155(3): 1151-64.

Salomon, B, DJ Lenschow, L Rhee, N Ashourian, B Singh, A Sharpe and JA Bluestone, 2000. **B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes.** *Immunity* 12(4): 431-40.

Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., Cardell, E. L. and Doetschman, T. (1997). **TGFbeta2 Knockout Mice have Multiple Developmental Defects that are Non-Overlapping with Other TGFbeta Knockout Phenotypes.** *Development* 124, 2659-2670.

Santibanez, J. F., Quintanilla, M., y Bernabeu, C. (2011). **TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions.** *Clinical science*, 121(6), 233-51.

Sarris, M, KG Andersen, F Randow, L Mayr and AG Betz, 2008. **Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition.** *Immunity* 28(3): 402-13.

Savage, C., Das, P., Finelli, A. L., Townsend, S. R., Sun, C. Y., Baird, S. E., y Padgett, R. W. (1996). **Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), 790-4.

Schmierer, B and CS Hill, 2007. **TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 970-82.

Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. 1991. **Development and function of Tcells in mice rendered IL-2 deficient by gene targeting.** *Nature*; 352:6241-4.

Schraml BU, Hildner K, Ise W, Lee WL, Smith WA, Solomon B, Sahota G, Sim J, Mukasa R, Cemerski S, Hatton RD, Stormo GD, Weaver CT, Russell JH, Murphy TL, Murphy KM. 2009. **The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation.** *Nature*. Jul 16;460(7253):405-9.

Schultz-Cherry, S. and Murphy-Ullrich, J. E. (1993). **Thrombospondin Causes Activation of Latent Transforming Growth Factor-Beta Secreted by Endothelial Cells by a Novel Mechanism.** *J. Cell Biol.* 122, 923-932.

Sebastiani, S, P Allavena, C Albanesi, F Nasorri, G Bianchi, C Traidl, S Sozzani, G Girolomoni and A Cavani, 2001. **Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity.** *J Immunol* 166(2): 996-1002.

Seder, RA, R Gazzinelli, A Sher and WE Paul, 1993. **Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 10188-92.

Seki, K. and Hata, A. (2004). **Indian Hedgehog Gene is a Target of the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway.** *J. Biol. Chem.* 279, 18544-18549.

Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C. H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D. A., y Schwabe, R. F. (2007). **TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis.** *Nat Med*, 13(11), 1324-32.

- Sekiya, T., Adachi, S., Kohu, K., Yamada, T., Higuchi, O., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Nakamura, T., Tashiro, K., Kuhara, S., Ohwada, S., y Akiyama, T. (2004). **Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells.** *The Journal of biological chemistry*, 279(8), 6840-6.
- Sekiya T, Oda T, Matsuura K, Akiyama T. 2004. **Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling.** *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 30;320(3):680-4.
- Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A. and Massague, J. (2004). **Integration of Smad and Forkhead Pathways in the Control of Neuroepithelial and Glioblastoma Cell Proliferation.** *Cell* 117, 211-223.
- Serra, P, A Amrani, J Yamanouchi, B Han, S Thiessen, T Utsugi, J Verdaguer and P Santamaria, 2003. **CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells.** *Immunity* 19(6): 877-89.
- Shalev, I, H Liu, C Kosciak, A Bartczak, M Javadi, KM Wong, A Maknoja, W He, MF Liu, J Diao, E Winter, J Manuel, D McCarthy, M Catral, J Gommerman, DA Clark, MJ Phillips, RR Gorczynski, L Zhang, G Downey, D Grant, MI Cybulsky and G Levy, 2008. **Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis.** *J Immunol* 180(1): 249-60.
- Sharma R, Zheng L, Deshmukh US, Jarjour WN, Sung SS, Fu SM, Ju ST. 2007. **A regulatory T cell-dependent novel function of CD25 (IL-2Ralpha) controlling memory CD8(+) T cell homeostasis.** *J Immunol.* Feb 1;178(3):1251-5.
- Shevach, EM, 2006. **From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells.** *Immunity* 25(2): 195-201.
- Shevach, EM, 2009. **Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression.** *Immunity* 30(5): 636-45.
- Shi, Y., y Massagué, J. (2003). **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** *Cell*, 113(6), 685-700.
- Shin, I., Bakin, A. V., Rodeck, U., Brunet, A. and Arteaga, C. L. (2001). **Transforming Growth Factor Beta Enhances Epithelial Cell Survival Via Akt-Dependent Regulation of FKHRL1.** *Mol. Biol. Cell* 12, 3328-3339.
- Shull, MM, I Ormsby, AB Kier, S Pawlowski, RJ Diebold, M Yin, R Allen, C Sidman, G Proetzel, D Calvin and et al., 1992. **Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease.** *Nature* 359(6397): 693-9.
- Smeltz, RB, J Chen, R Ehrhardt and EM Shevach, 2002. **Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression.** *J Immunol* 168(12): 6165-72.

Smith KA. 1988. **Interleukin-2: inception, impact, and implications.** *Science*. May 27;240(4856):1169-76.

Song K, Wang H, Krebs TL, Danielpour D. 2006. **Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation.** *EMBO J*. Jan 11;25(1):58-69.

Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C. H. and Landstrom, M. (2008). **The Type I TGF-Beta Receptor Engages TRAF6 to Activate TAK1 in a Receptor Kinase-Independent Manner.** *Nat. Cell Biol.* **10**, 1199-1207.

Staal FJ, Clevers HC. 2003. **Wnt signaling in the thymus.** *Curr Opin Immunol*. Apr;15(2):204-8.

Stanley E, Biben C, Kotecha S, Fabri L, Tajbakhsh S, Wang CC, Hatzistavrou T, Roberts B, Drinkwater C, Lah M, Buckingham M, Hilton D, Nash A, Mohun T, Harvey RP. 1998. **DAN is a secreted glycoprotein related to Xenopus cerberus.** *Mech Dev*. Oct;77(2):173-84.

Stavnezer J. 1995. **Regulation of antibody production and class switching by TGF- β .** *J. Immunol*. 155:1647–51).

Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL. 2009. **Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin.** *PLoS One*. Jun 22;4(6):e5994. doi: 10.1371/journal.pone.0005994.

Sun, CM, JA Hall, RB Blank, N Bouladoux, M Oukka, JR Mora and Y Belkaid, 2007. **Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid.** *J Exp Med* 204(8): 1775-85.

Sung JL, Lin JT, Gorham JD. 2003. **CD28 co-stimulation regulates the effect of transforming growth factor-beta1 on the proliferation of naïve CD4+ T cells.** *Int Immunopharmacol*. Feb;3(2):233-45.

Swain, SL, AD Weinberg, M English and G Huston, 1990. **IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors.** *J Immunol* 145(11): 3796-806.

Swihart, K, U Fruth, N Messmer, K Hug, R Behin, S Huang, G Del Giudice, M Aguet and JA Louis, 1995. **Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with Leishmania major but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response.** *J Exp Med* 181(3): 961-71.

Szabo, SJ, AS Dighe, U Gubler and KM Murphy, 1997. **Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells.** *J Exp Med* 185(5): 817-24.

Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Saika S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A. 2010. **Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development.** *J Immunol*. Jul 15;185(2):842-55. doi: 10.4049/jimmunol.0904100.

Taniguchi T, Minami Y. 1993. **The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview.** *Cell*. Apr 9;73(1):5-8.

Tang, Q, EK Boden, KJ Henriksen, H Bour-Jordan, M Bi and JA Bluestone, 2004. **Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function.** *Eur J Immunol* 34(11): 2996-3005.

Thompson, HS, N Harper, DJ Bevan and NA Staines, 1993. **Suppression of collagen induced arthritis by oral administration of type II collagen: changes in immune and arthritic responses mediated by active peripheral suppression.** *Autoimmunity* 16(3): 189-99.

Thornton, AM, PE Korty, DQ Tran, EA Wohlfert, PE Murray, Y Belkaid and EM Shevach, 2010. **Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells.** *J Immunol* 184(7): 3433-41.

Thornton, AM and EM Shevach, 1998. **CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production.** *J Exp Med* 188(2): 287-96.

Thorstenson, KM and A Khoruts, 2001. **Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen.** *J Immunol* 167(1): 188-95.

Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. 2005. **Latent TGF-beta binding proteins.** *Int J Biochem Cell Biol. Jan;37(1):38-41.*

Togo, N., Ohwada, S., Sakurai, S., Toya, H., Sakamoto, I., Yamada, T., Nakano, T., Muroya, K., Takeyoshi, I., Nakajima, T., Sekiya, T., Yamazumi, Y., Nakamura, T., y Akiyama, T. (2008). **Prognostic significance of BMP and activin membrane-bound inhibitor in colorectal cancer.** *World J Gastroenterol*, 14(31), 4880-8.

Tone, Y, K Furuuchi, Y Kojima, ML Tykocinski, MI Greene and M Tone, 2008. **Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer.** *Nat Immunol* 9(2): 194-202.

Tramullas, M., Lantero, A., Diaz, A., Morchon, N., Merino, D., Villar, A., Buscher, D., Merino, R., Hurle, J. M., Izpisua-Belmonte, J. C., y Hurle, M. A. (2010). **BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation.** *J Neurosci*, 30(4), 1502-11.

Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. 1998. **SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor.** *Cell. Dec 11;95(6):779-91.*

Umulis, D., O'Connor, M. B., y Blair, S. S. (2009). **The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling.** *Development*, 136(22), 3715-28.

van Meeteren, L. A., y Ten Dijke, P. (2011). **Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta.** *Cell Tissue Res.*

van Ginkel, FW, SM Wahl, JF Kearney, MN Kweon, K Fujihashi, PD Burrows, H Kiyono and JR McGhee, 1999. **Partial IgA-deficiency with increased Th2-type cytokines in TGF-beta 1 knockout mice.** *J Immunol* 163(4): 1951-7.

Veldhoen, M, RJ Hocking, CJ Atkins, RM Locksley and B Stockinger, 2006. **TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.** *Immunity* 24(2): 179-89.

Veldhoen, M, C Uyttenhove, J van Snick, H Helmbj, A Westendorf, J Buer, B Martin, C Wilhelm and B Stockinger, 2008. **"Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset".** *Nat Immunol* 9(12): 1341-6.

Vermeire, K, H Heremans, M Vandeputte, S Huang, A Billiau and P Matthys, 1997. **Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice.** *J Immunol* 158(11): 5507-13.

Vieira, PL, JR Christensen, S Minaee, EJ O'Neill, FJ Barrat, A Boonstra, T Barthlott, B Stockinger, DC Wraith and A O'Garra, 2004. **IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells.** *J Immunol* 172(10): 5986-93.

Villar AV, García R, Llano M, Cobo M, Merino D, Lantero A, Tramullas M, Hurlé JM, Hurlé MA, Nistal JF. 2013. **BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF-β signaling.** *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb;1832(2):323-35. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.11.007.

Vogelzang, A, HM McGuire, D Yu, J Sprent, CR Mackay and C King, 2008. **A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells.** *Immunity* 29(1): 127-37.

Wan, YY and RA Flavell, 2006. **The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells.** *Immunol Rev* 212: 114-30.

Wanninger J, Neumeier M, Bauer S, Weiss TS, Eisinger K, Walter R, Dorn C, Hellerbrand C, Schäffler A, Buechler C. 2011. **Adiponectin induces the transforming growth factor decoy receptor BAMBI in human hepatocytes.** *FEBS Lett.* May 6;585(9):1338-44. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.003.

Wang, B, I Andre, A Gonzalez, JD Katz, M Aguet, C Benoist and D Mathis, 1997. **Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13844-9.

Wang J, Lee S, Teh CE, Bunting K, Ma L, Shannon MF. 2009. **The transcription repressor, ZEB1, cooperates with CtBP2 and HDAC1 to suppress IL-2 gene activation in T cells.** *Int Immunol.* Mar;21(3):227-35. doi: 10.1093/intimm/dxn143.

Watanabe, T, J Suzuki, A Mitsuo, S Nakano, Y Tamayama, A Katagiri, H Amano, S Morimoto, Y Tokano and Y Takasaki, 2008. **Striking alteration of some populations of T/B cells in systemic lupus erythematosus: relationship to expression of CD62L or some chemokine receptors.** *Lupus* 17(1): 26-33.

Webster KE, Walters S, Kohler RE, Mrkvan T, Boyman O, Surh CD, Grey ST, Sprent J. 2009. **In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term**

acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med.* Apr 13;206(4):751-60. doi: 10.1084/jem.20082824.

Weiner, HL, 2001a. **Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells.** *Immunol Rev* 182: 207-14.

Weiner, HL, 2001b. **Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells.** *Microbes Infect* 3(11): 947-54.

Wenner, CA, ML Guler, SE Macatonia, A O'Garra and KM Murphy, 1996. **Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development.** *J Immunol* 156(4): 1442-7.

Wharton, K., y Derynck, R. (2009). **TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease.** *Development*, 136(22), 3691-7.

Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. 1995. **IL-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment.** *Immunity*;3:521-30.

Wilson, NJ, K Boniface, JR Chan, BS McKenzie, WM Blumenschein, JD Mattson, B Basham, K Smith, T Chen, F Morel, JC Lecron, RA Kastelein, DJ Cua, TK McClanahan, EP Bowman and R de Waal Malefyt, 2007. **Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells.** *Nat Immunol* 8(9): 950-7.

Williams, LM and AY Rudensky, 2007. **Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3.** *Nat Immunol* 8(3): 277-84.

Williams TM, Moolten D, Burlein J, Romano J, Bhaerman R, Godillot A, Mellon M, Rauscher FJ 3rd, Kant JA. 1991. **Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression.** *Science. Dec 20;254(5039):1791-4.*

Wilkes, M. C., Murphy, S. J., Garamszegi, N. and Leof, E. B. (2003). **Cell-Type-Specific Activation of PAK2 by Transforming Growth Factor Beta Independent of Smad2 and Smad3.** *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8878-8889

Wilkes, M. C., Mitchell, H., Penheiter, S. G., Dore, J. J., Suzuki, K., Edens, M., Sharma, D. K., Pagano, R. E. and Leof, E. B. (2005). **Transforming Growth Factor-Beta Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase is Independent of Smad2 and Smad3 and Regulates Fibroblast Responses Via p21-Activated Kinase-2.** *Cancer Res.* **65**, 10431-10440.

Wuest SC, Edwan JH, Martin JF, Han S, Perry JS, Cartagena CM, Matsuura E, Maric D, Waldmann TA, Bielekova B. 2011. **A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy.** *Nat Med.* May;17(5):604-9. doi: 10.1038/nm.2365.

- Wurthner JU, Frank DB, Felici A, Green HM, Cao Z, Schneider MD, McNally JG, Lechleider RJ, Roberts AB. 2001. **Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone.** *J Biol Chem.* Jun 1;276(22):19495-502.
- Xavier S, Gilbert V, Rastaldi MP, Krick S, Kollins D, Reddy A, Bottinger E, Cohen CD, Schlondorff D. 2010. **BAMBI is expressed in endothelial cells and is regulated by lysosomal/autolysosomal degradation.** *PLoS One.* Sep 24;5(9):e12995. doi: 10.1371/journal.pone.0012995.
- Xiao, S, H Jin, T Korn, SM Liu, M Oukka, B Lim and VK Kuchroo, 2008. **Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression.** *J Immunol* 181(4): 2277-84.
- Xu, L, A Kitani, I Fuss and W Strober, 2007. **Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3-T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta.** *J Immunol* 178(11): 6725-9.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1995). **Identification of a Member of the MAPKKK Family as a Potential Mediator of TGF-Beta Signal Transduction.** *Science* **270**, 2008-2011.
- Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K. 1997. **Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow.** *Stem Cells.* ;15(2):144-53.
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z. and Zhang, Y. E. (2008). **TRAF6 Mediates Smad-Independent Activation of JNK and p38 by TGF-Beta.** *Mol. Cell* **31**, 918-924.
- Yan X, Lin Z, Chen F, Zhao X, Chen H, Ning Y, Chen YG. 2009. **Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling.** *J Biol Chem.* Oct 30;284(44):30097-104. doi: 10.1074/jbc.M109.049304.
- Yanagisawa M, Nakashima K, Takeda K, Ochiai W, Takizawa T, Ueno M, Takizawa M, Shibuya H, Taga T. 2001. **Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7.** *Genes Cells.* Dec;6(12):1091-9.
- Yang L, Cohn L, Zhang DH, Homer R, Ray A, Ray P. 1998. **Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation.** *J Exp Med.* Nov 2;188(9):1739-50.
- Yang, L, DE Anderson, C Baecher-Allan, WD Hastings, E Bettelli, M Oukka, VK Kuchroo and DA Hafler, 2008a. **IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells.** *Nature* 454(7202): 350-2.
- Yang, XO, R Nurieva, GJ Martinez, HS Kang, Y Chung, BP Pappu, B Shah, SH Chang, KS Schluns, SS Watowich, XH Feng, AM Jetten and C Dong, 2008b. **Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs.** *Immunity* 29(1): 44-56.

- Yang, XO, AD Panopoulos, R Nurieva, SH Chang, D Wang, SS Watowich and C Dong, 2007. **STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells.** *J Biol Chem* 282(13): 9358-63.
- Yang, XO, BP Pappu, R Nurieva, A Akimzhanov, HS Kang, Y Chung, L Ma, B Shah, AD Panopoulos, KS Schluns, SS Watowich, Q Tian, AM Jetten and C Dong, 2008c. **T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.** *Immunity* 28(1): 29-39.
- Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, Hirahara K, Sun HW, Wei L, Vahedi G, Kanno Y, O'Shea JJ, Laurence A. 2011. **Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5.** *Nat Immunol.* Mar;12(3):247-54. doi: 10.1038/ni.1995. .
- Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. 2006. **The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells.** *Cell Mol Immunol.* Jun;3(3):189-95
- Yi, J. Y., Shin, I. and Arteaga, C. L. (2005). **Type I Transforming Growth Factor Beta Receptor Binds to and Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase.** *J. Biol. Chem.* **280**, 10870-10876.
- Yu, D, M Batten, CR Mackay and C King, 2009. **Lineage specification and heterogeneity of T follicular helper cells.** *Curr Opin Immunol* 21(6): 619-25.
- Yu, D and CG Vinuesa, 2010. **The elusive identity of T follicular helper cells.** *Trends Immunol* 31(10): 377-83.
- Yu, L., Hebert, M. C., y Zhang, Y. E. (2002). **TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses.** *EMBO J*, 21(14), 3749-59.
- Yui MA, Sharp LL, Havran WL, Rothenberg EV. 2004. **Preferential activation of an IL-2 regulatory sequence transgene in TCR gamma delta and NKT cells: subset-specific differences in IL-2 regulation.** *J Immunol.* Apr 15;172(8):4691-9.
- Zhang, F, G Meng and W Strober, 2008. **Interactions among the transcription factors Runx1, RORgammat and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17-producing T cells.** *Nat Immunol* 9(11): 1297-306.
- Zhang, GX, B Gran, S Yu, J Li, I Siglienti, X Chen, M Kamoun and A Rostami, 2003. **Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system.** *J Immunol* 170(4): 2153-60.
- Zhang, YE, 2009. **Non-Smad pathways in TGF-beta signaling.** *Cell Res* 19(1): 128-39.
- Zhang, Y., Feng, X., We, R., y Derynck, R. 1996. **Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response.** *Nature*, 383(6596), 168-72.
- Zheng, W and RA Flavell, 1997. **The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells.** *Cell* 89(4): 587-96.

Zheng, Y, S Josefowicz, A Chaudhry, XP Peng, K Forbush and AY Rudensky, 2010. **Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate.** *Nature* 463(7282): 808-12.

Zheng, Y, SZ Josefowicz, A Kas, TT Chu, MA Gavin and AY Rudensky, 2007. **Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells.** *Nature* 445(7130): 936-40.

Zhou, L, MM Chong and DR Littman, 2009. **Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation.** *Immunity* 30(5): 646-55.

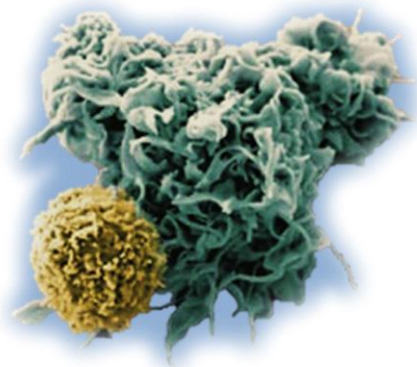
Zhou, L, JE Lopes, MM Chong, Ivanov, II, R Min, GD Victora, Y Shen, J Du, YP Rubtsov, AY Rudensky, SF Ziegler and DR Littman, 2008. **TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function.** *Nature* 453(7192): 236-40.

Zhu, J and WE Paul, 2008. **CD4 T cells: fates, functions, and faults.** *Blood* 112(5): 1557-69.

Zimmerman LB, De Jesús-Escobar JM, Harland RM. 1996. **The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4.** *Cell. Aug 23;86(4):599-606.*

Zorn E, Ritz J. 2006. **Studying human regulatory T cells in vivo.** *Clin Cancer Res. Sep 15;12(18):5265-7.*

***ANEXO: PUBLICACIONES
DEL PERIODO DOCTORAL***



Mice Deficient in CD38 Develop an Attenuated Form of Collagen Type II-Induced Arthritis

Jorge Postigo¹, Marcos Iglesias^{1,2}, Daniela Cerezo-Wallis³, Antonio Rosal-Vela³, Sonia García-Rodríguez³, Mercedes Zubiaur³, Jaime Sancho³, Ramón Merino^{1,2*}, Jesús Merino^{1*}

1 Departamento de Biología Molecular, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria, Santander, Spain, **2** Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria/CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain, **3** Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada, Spain

Abstract

CD38, a type II transmembrane glycoprotein expressed in many cells of the immune system, is involved in cell signaling, migration and differentiation. Studies in CD38 deficient mice (CD38 KO mice) indicate that this molecule controls inflammatory immune responses, although its involvement in these responses depends on the disease model analyzed. Here, we explored the role of CD38 in the control of autoimmune responses using chicken collagen type II (col II) immunized C57BL/6-CD38 KO mice as a model of collagen-induced arthritis (CIA). We demonstrate that CD38 KO mice develop an attenuated CIA that is accompanied by a limited joint induction of IL-1 β and IL-6 expression, by the lack of induction of IFN γ expression in the joints and by a reduction in the percentages of invariant NKT (iNKT) cells in the spleen. Immunized CD38 KO mice produce high levels of circulating IgG1 and low of IgG2a anti-col II antibodies in association with reduced percentages of Th1 cells in the draining lymph nodes. Altogether, our results show that CD38 participates in the pathogenesis of CIA controlling the number of iNKT cells and promoting Th1 inflammatory responses.

Citation: Postigo J, Iglesias M, Cerezo-Wallis D, Rosal-Vela A, García-Rodríguez S, et al. (2012) Mice Deficient in CD38 Develop an Attenuated Form of Collagen Type II-Induced Arthritis. PLoS ONE 7(3): e33534. doi:10.1371/journal.pone.0033534

Editor: Jose Carlos Alves-Filho, University of São Paulo, Brazil

Received: December 1, 2011; **Accepted:** February 10, 2012; **Published:** March 16, 2012

Copyright: © 2012 Postigo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain to RM (SAF2008-02042 and SAF2011-22463), JM (BFU2009-07206) and JS and MZ (SAF-2008-03685, SAF2011-27261), from the Fundación Marqués de Valdecilla-Leonardo Torres Quevedo, Spain to JM and RM (FMV-UC 08/02), from the European Commission-European Regional Development Fund (ERDF/FEDER), in collaboration with ISCIII-FIS06/1502 (MZ), from the Junta de Andalucía, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia to JS and MZ (CVI-226, and PC08-CTS-04046) and from Fundación Eugenio Rodríguez Pascual to RM. SGR is supported by a JAE-Doc-CSIC-Contract and ARV is recipient of a Fellowship-Contract from the Junta de Andalucía. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: merinor@unican.es (RM); merinoj@unican.es (JM)

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) glycohydrolase CD38 (EC 3.2.2.5) is a type II transmembrane glycoprotein widely expressed in many cell population of the immune system, including B and T cells, NK cells, circulating monocytes and DC as well as in non-hematopoietic cells [1,2]. This molecule acts as an ectoenzyme that catalyzes the formation of adenosine diphosphate ribose (ADPR), cyclic ADPR (cADPR), and nicotinamide from NAD⁺ under neutral pH; or nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP⁺) from NADP⁺ under acidic conditions [1–5]. Both cADPR and NAADP⁺ are potent endogenous activators of intracellular Ca²⁺ release and function as signaling molecules in leukocytes and other CD38 expressing non-hematopoietic cells [6]. In addition to its ectoenzyme activity, CD38 can also function as a plasma membrane signaling receptor in leukocytes [2,7] interacting with CD31/PECAM-1 expressed by endothelial cells and other cell lineages. This interaction promotes leukocyte proliferation, T cell activation, monocyte-derived DC maturation, survival and migration and induces Th1 polarization in co-cultures of DC with CD4⁺ T lymphocytes [8–10]. In this regard, our studies indicate that CD38 is located in privileged sites for signaling and cell-communication such as

membrane rafts, immunological synapse, recycling endosomes, and exosomes [10–13]. Moreover, CD38 signaling potential varies depending upon the cellular context and its physical and/or functional association with other signaling molecules [10,12,13].

Studies in CD38 deficient mice (CD38 KO mice) highlight the importance of this molecule for the appropriated functioning of the immune system. CD38 deficiency has been associated with defects in humoral B-cell responses [14,15], neutrophil migration [16] and DC trafficking [15]. In CD38 KO mice, the numbers of peripheral Tregs and invariant NKT (iNKT) cells are reduced as a result of a NAD⁺-induced cell death process [17,18]. The extracellular accumulation of NAD⁺ occurring in these mice induces the ADP ribosyltransferase-2 (ART-2)-mediated ADP-ribosylation of the P2X7 purinergic receptor and its ATP-independent activation which initiates the apoptotic process [19]. Thus, CD38 acts as a critical regulator of inflammatory and innate immune responses and CD38 deficiency in NOD mice accelerates the development of type I diabetes (T1D) [17]. In NOD mice activation of iNKT cells with the superagonist α -galactosylceramide leads to differentiation of tolerogenic DC, which inhibits the development of T1D [18]. In contrast, in the absence of CD38, ART-2 preferentially activates apoptotic deletion of CD4⁺ iNKT cells and accelerates T1D onset [18].

However, it should be stressed that iNKT cells through the production of IL-17 may also have pro-inflammatory effects as occurs during the development of collagen type II-induced arthritis (CIA) where mice deficient or depleted in such cells develop an attenuated form of disease [20,21]. Moreover, activation of iNKT cells in the C57BL/6 (B6) background, unlike in the NOD genetic background, has an adjuvant-like effect that enhances various immunological responses including the downstream differentiation of non-tolerogenic DCs [22]. In this regard, CD38 KO mice in the B6 genetic background develop milder inflammatory lesions in a model of post-ischemic inflammation and brain injury after temporary middle cerebral artery occlusion, although a direct relationship between this protective effect and changes in iNKT cells has not been established [23]. Inflammatory responses and airway hyperreactivity are also attenuated in allergen-challenged CD38 KO mice [24,25]. Moreover, in SLE patients increased numbers of CD38⁺ B cells have been observed and in patients with active disease, B cells expressing high levels of CD38 produce IgG anti-dsDNA autoantibodies [26].

Based in these apparently conflicting results, in the present study we have explored the contribution of CD38 to the control of autoimmunity using the experimental model of collagen type II (col II)-induced arthritis (CIA) in CD38 KO mice. We demonstrate here that in comparison to WT mice, CD38 KO mice develop an attenuated form of CIA in association with lower percentages of iNKT cells and a down-modulation in Th1 immune responses.

Results

Development of an attenuated CIA in CD38 KO mice

In the present study we explored whether the deficiency in CD38 influenced the clinical progression of CIA in B6 mice. To this end, we immunized WT and CD38 KO mice with chicken col II-CFA. The cumulative incidence of CIA was slightly, although not significantly, lower in CD38 KO mice than in WT mice (Figure 1A). However, the clinical severity of CIA was also lower in CD38 KO mice than in WT mice (Figure 1B). To further analyze the degree of paw inflammation during CIA development, the thickness of the paws at the level of the metacarpus and metatarsus was measured with a digital caliper 7 weeks after col II-immunization. A 90% of WT mice (19/21 mice) exhibited a significant inflammation of the paws (inflammation values higher than the mean $\pm$ 3SD of those found in non-immunized controls), whereas only 30% (6/20 mice) of col II-immunized CD38 KO mice showed signs of paw inflammation (Figure 1C). In correlation with the clinical findings, the severity of every individual radiological sign considered here (soft tissue swelling, juxtaarticular osteopenia, narrowing or disappearance of the interosseous spaces reflecting cartilage loss and bone irregularities secondary to periosteal new bone formation and/or marginal articular erosions) was significantly lower in CD38 KO than in WT mice (Figure 2A and B). The histological analyses of the joints in CD38 KO mice failed to show signs of cartilage destruction although showed the presence of synovitis and pannus formation (Figure 2C). All these lesions were present in WT mice (Figure 2C).

Reduced number of iNKTs and lack of involvement of Tregs in the protection against CIA of CD38 KO mice

It has been reported that Tregs are very susceptible to the pro-apoptotic effects of extracellular NAD⁺ and accordingly, CD38 KO mice exhibit low numbers of this cell population [17]. In agreement with these results, the number of lymph node Tregs in our non-immunized CD38 KO mice were significantly lower than in WT mice (Figure 3A). However, this cell population increased

to similar levels in both CD38 KO and WT mice after col II immunization (Figure 3A).

We then explored whether the increase in the number of Tregs after the immunization with col II-CFA in CD38 KO mice was involved in the protection against CIA. To this end, groups of WT and CD38 KO mice were either depleted in Tregs with a cytotoxic anti-CD25 mAb or treated with PBS as a control, prior to the induction of CIA. Again, the severity of CIA was lower in PBS-treated CD38 KO than in PBS-treated WT mice and this severity did not increase after depletion of Tregs in both groups of mice (Figure 3B).

Similarly to Tregs, iNKT cells are also very susceptible to the pro-apoptotic effects of extracellular NAD⁺ [18]. In this regard, the number of iNKT cells in the spleen of non-immunized CD38 KO mice was severely reduced in comparison to WT mice (Figure 3C). However, unlike Tregs, the immunization with col II-CFA induced a significant increase of iNKT cells in WT, but not in CD38 KO mice (Figure 3C).

Altered anti-col II antibody production in CD38 KO mice

The intensity and quality of anti-col II humoral immune responses was compared between col II-immunized CD38 KO and WT mice by analyzing the levels of circulating IgG1 and IgG2a anti-col II antibodies. Both groups of mice exhibited strong anti-col II antibody responses 3 and 6 weeks after CIA-induction (Figure 4). However, qualitative differences in these antibody responses were observed between CD38 KO and WT mice. Thus, serum levels of IgG1 anti-col II antibodies were significantly higher at both 3 and 6 weeks after immunization in CD38 KO mice as compared with those in WT mice. In contrast, the levels of IgG2a anti-col II antibodies were significantly higher in WT than in CD38 KO mice at 6 weeks upon immunization, whereas the differences were not statistically significant at the onset of the disease (Figure 4), suggesting that CD38 KO mice show an altered Th1/Th2 balance in response to col II immunization.

Reduced joint expression of pro-inflammatory cytokines and altered Th1 cytokine pattern in CD38 KO mice

The reduced severity of CIA in CD38 KO mice together with the altered anti-col II antibody responses compared to WT mice, prompted us to explore by quantitative real time RT-PCR the pattern of cytokine expression in the joints during the induction of CIA in these strains of mice. As expected [27], a significant increase in the expression of the arthritogenic IL-1 β , TNF α and IL-6 transcripts was observed in the joints of WT mice 7 weeks after immunization with col II-CFA (Figure 5). In addition, joint levels of TGF β 1, IL-10, IFN γ , IL-4 and IL-17 mRNAs were augmented in WT mice with arthritis (Figure 5). In parallel with the clinical, radiological and histological findings, the expression of IL-1 β and IL-6, but not of TNF α was reduced in the joints of col II-immunized CD38 KO mice (Figure 5). The reduced severity of CIA in CD38 KO mice was not accompanied by an increased joint expression of the TGF β 1 and IL-10 inhibitory cytokines (Figure 5). Unlike WT mice, the expression of IFN γ , the prototypical Th1 cytokine, was not induced in the joints of CD38 KO mice after CIA induction (Figure 5) Although the differences were not statistically significant, the induction in the expression of IL-4 and IL-17 and in the joints of CD38 KO mice was higher and lower, respectively, than the observed in WT mice (Figure 5).

Differential induction of Th1, but not Th17 cells after CIA induction in CD38 KO and WT mice

Due to the pattern of cytokine expression in the joints and to further explore the mechanisms implicated in the amelioration of

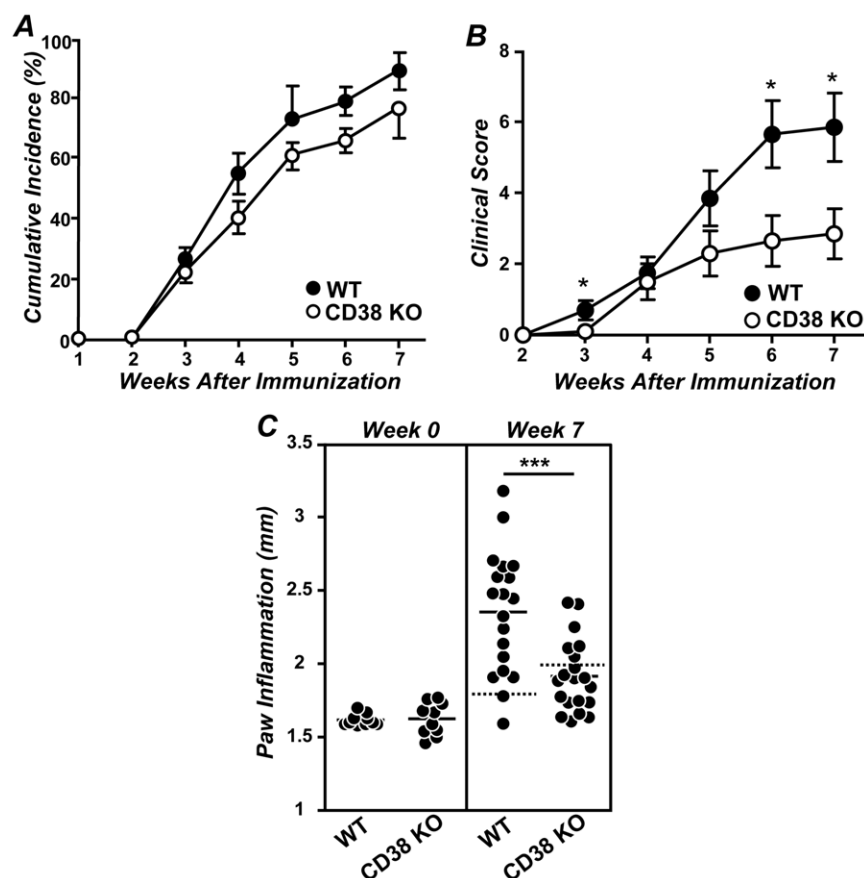


Figure 1. Involvement of CD38 in the development of CIA. (A) Cumulative incidence of CIA. Results are expressed as the mean $\pm$ SD of the percentage of affected mice at the indicated weeks after immunization. (B) Clinical severity of CIA at different periods after immunization with col II-CFA. Results are expressed as the mean $\pm$ SD of the clinical score in each mouse. (C) Paw inflammation was measured 7 weeks after immunization using a digital caliper. The mean values of the inflammation in the four paws of every individual mouse are expressed. Solid bars represent the mean value of each examination. Dotted bars represent the mean $\pm$ 3SD of the values found in their respective non-immunized control groups. Statistic differences between WT and CD38 KO mice are indicated as follow: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0033534.g001

CIA in CD38 KO mice, we compared the number of different functional CD4⁺ T-cell subpopulations in the draining lymph nodes of WT and CD38 KO mice before and after immunization with col II-CFA. Both IFN γ -producing Th1 and IL-17-producing Th17 cell populations were augmented in the paraaortic lymph nodes of WT mice 3 weeks after immunization with col II-CFA (Figure 6). A similar increase in the number of Th17 cells was observed in CD38 KO mice. Although the number of CD4⁺IFN γ Th1 cells in the draining lymph nodes of immunized CD38 KO mice was also higher than in non-immunized mice, such an increase was significantly lower than the observed in immunized WT mice in correlation with the reduced IFN γ expression in the joints and of circulating IgG2a anti-col II antibody responses (Figure 6).

Discussion

Different studies in experimental murine models of inflammatory/autoimmune diseases reveal some discrepancies about the role of CD38 in the control of pathological immune responses [17,18,23–26]. Here, we extend these previous observations by analyzing the contribution of CD38 to the pathogenesis of CIA, a paradigmatic model of autoimmune disease mediated by Th1 and Th17 lymphocytes. Our results show that the severity of CIA in

CD38 KO mice is lower than in WT mice. These results clearly contrast with the development of accelerated diabetes in NOD mice deficient in CD38, partly because of a loss of iNKT cells and Tregs [17,18] that are highly sensitive to NAD-induced cell death activated by ART-2-mediated ADP ribosylation of P2X7 receptors [19]. However, after immunization of CD38 KO mice with col II-CFA, the number of Tregs reaches that of immunized WT mice. Although the reasons for the increase in Treg observed in immunized CD38 KO mice are not clear yet, the experiments in animals depleted in these cells after treatment with a cytotoxic anti-CD25 mAb clearly indicate that this regulatory T cell population does not play a role in the protection against CIA observed in such mice. One intriguing finding in our study is the lack of exacerbation of CIA in Treg-depleted WT mice which contrasts with the increase in arthritis severity after anti-CD25 treatment observed by others [28,29]. However, these discrepancies can be attributed to the different models of inflammatory arthritis used in these studies and/or to the different timing of anti-CD25 mAb administration during the development of the disease. In this regard, in our study the anti-CD25 treatment is administered once prior to the induction of CIA instead of the 4 weeks-long treatment initiated 13 days after col II-immunization used by Kelchtermans et al [28]. In addition, the treatment protocol used here has been proved to be able to reverse the

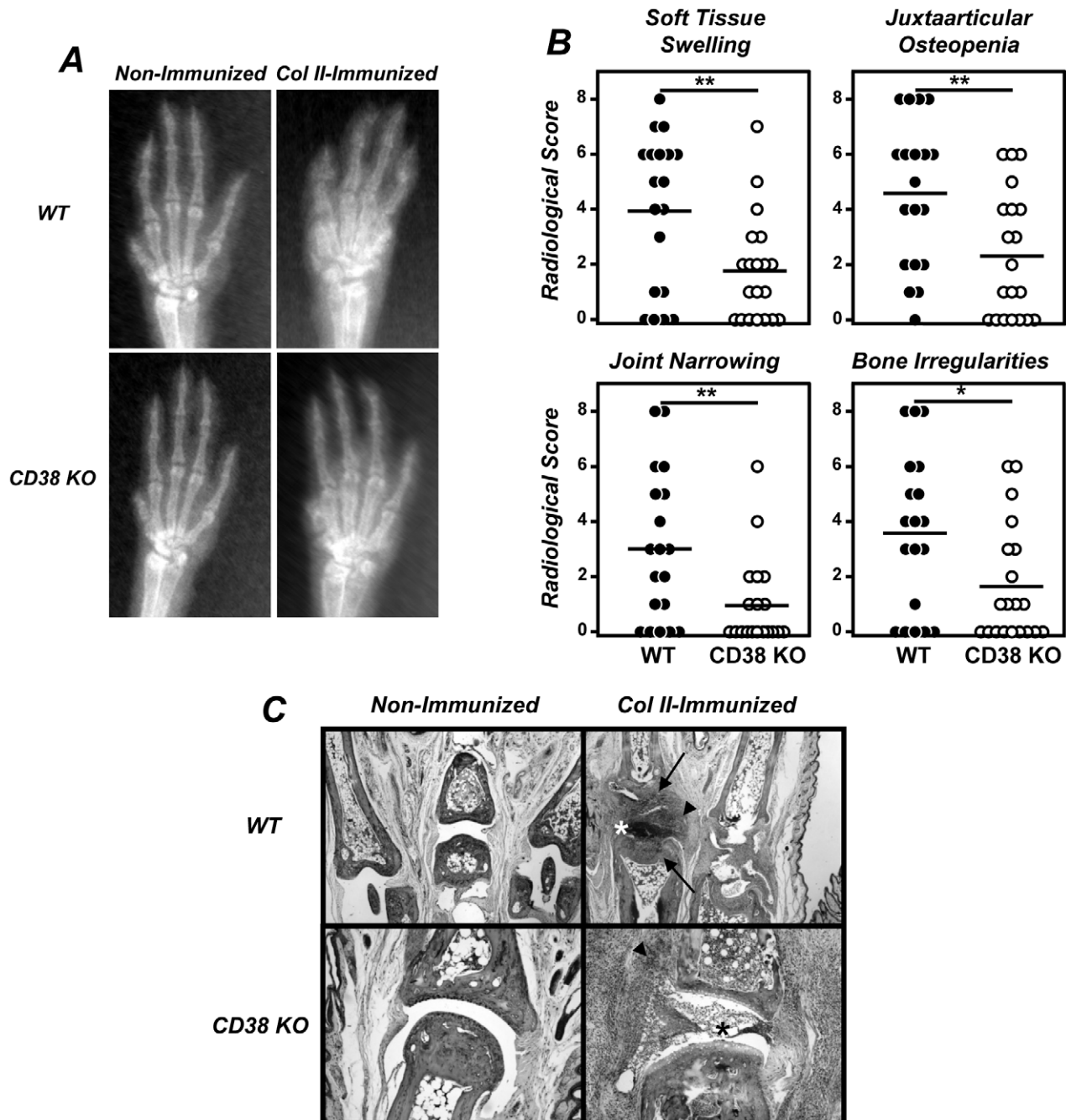


Figure 2. Reduced radiological and histological lesions in CIA developing CD38 KO mice. 8–12 weeks-old WT and CD38 KO male mice were immunized with col II-CFA. (A) Representative radiological images of the front paws of WT and CD38 KO mice, non-immunized and 7 weeks after immunization with col II-CFA. (B) Radiological score of four individual signs. Results are expressed as the values of individual mice. Bars represent the mean value of each examination. Statistic differences are indicated as follow: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C) Representative histological appearance of the joints ($\times 10$) of WT and CD38 KO mice non-immunized and 7 weeks after immunization with col II-CFA. Signs of cartilage and/or bone destruction (arrows), synovitis (arrow head) and pannus (*) are indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0033534.g002

protection against CIA in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T cells [30], further indicating that the lack of exacerbation of CIA in Treg-depleted WT mice is not related to the concomitant possible depletion of pathogenic CD4 cells expressing transitory CD25 after their activation.

Similarly to Tregs, the number of iNKT cells, that also possess regulatory properties in certain models of autoimmune diseases, is also reduced in CD38 KO mice [18]. This reduction has been

involved in the acceleration and aggravation of T1D in NOD mice [17]. However, iNKT cells through the production of IL-17 promote CIA development and mice deficient or depleted in such cells develop an attenuated form of disease resembling that of our B6 CD38 KO mice [20,21]. Moreover, activation of iNKT cells in the B6 background, unlike in the NOD genetic background, has an adjuvant-like effect that enhances various immunological responses including the downstream differentiation of non-

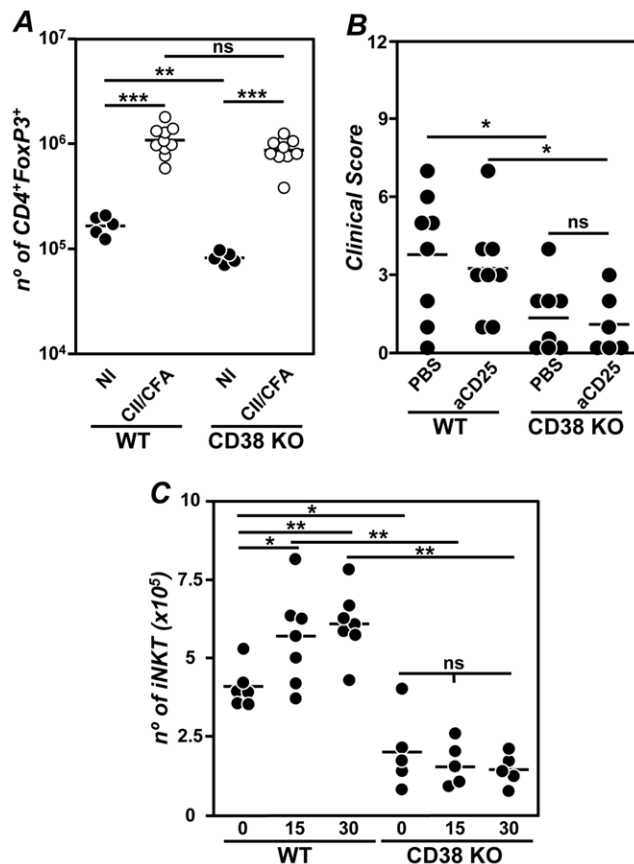


Figure 3. Lack of involvement of Tregs in the reduced CIA of CD38 KO mice. (A) Number of Tregs in the lymph nodes of WT and CD38 KO mice non-immunized (NI; ●) and 3 weeks after immunization with col-II-CFA (○). Representative results of 3 independent experiments are expressed as the values of individual mice. Bars represent the mean value of each examination. (B) Clinical severity of CIA 7 weeks after immunization with col II-CFA in PBS-treated or Treg-depleted WT and CD38 KO mice. Representative results of 2 independent experiments are expressed as the values of individual mice are expressed. Bars represent the mean value of each examination. (C) Number of iNKT cells in the spleen of WT mice and CD38 KO mice before (day 0) and 15 and 30 days after col II immunization. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Statistic differences are indicated as follow: ns: non-significant, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001. doi:10.1371/journal.pone.0033534.g003

tolerogenic DCs [22]. It is, therefore, likely that the reduction in the number of iNKT cells observed in CD38 KO mice, that are not recovered during CIA development, eventually contribute to the development of a mild arthritis in CD38 KO. According to this possibility, the consequences of CD38 deficiency in the acceleration or attenuation of different inflammatory processes may be in part related to the respective anti- or pro-inflammatory role of iNKT cells in such diseases.

The development of an attenuated CIA in CD38 KO mice can be also related with the capacity of CD38 to regulate the migration of DC precursors from the blood to peripheral sites as well as the migration of mature DCs to lymph nodes in response to CCL2, CCL19, CCL21, and CXCL12 chemokines [15] affecting in that way the correct priming of CD4⁺ T cells. In addition, considering that cADPR and NAADP⁺ are potent endogenous activators of intracellular Ca²⁺ release [6], the deficiency of CD38 may impair the activation of T cells. In this regard, CD38 KO mice immunized with low doses of T-dependent antigens precipitated with alum,

mount poor IgG1 antigen specific humoral immune responses [15]. However, the development in col II-immunized CD38 KO mice of strong collagen-specific humoral immune responses and the induction of a similar Th17 response than the observed in WT mice argues against the possibility of poor T-cell priming as the cause of the attenuated CIA in these CD38 deficient mice.

Studies performed in animals immunologically depleted or genetically deficient in B cells underlined the importance of humoral immune responses in the induction of CIA [31,32]. Strikingly, CD38 KO mice developing a less severe CIA than WT mice, exhibited higher serum levels of IgG1 and lower levels of IgG2a, anti-col II antibodies. The increase in the levels of IgG1 anti-col II antibodies observed in immunized CD38 KO mice contrasted with a previous report showing an impaired IgG1 humoral immune responses against T-dependent antigens in these mutant mice [15]. This discrepancy was probably attributed to the different immunization regimen used in both studies; the protocol used here for the induction of CIA required the use of high doses of col II emulsified in a *mycobacterium tuberculosis* enriched CFA instead of the immunization with very low doses of antigen precipitated with alum used in the former study. In fact, a direct comparison of humoral immune responses in CD38 KO mice reveals that the intensity of IgG1 immune responses, but not of IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgA humoral responses, to T-dependent antigens was highly dependent on both the dose of the antigen and the adjuvant employed in the immunization protocol [14]. Studies addressing the pathogenic activity of autoantibodies revealed the importance of the IgG subclass in their capacity to promote tissue injury. Thus, it was demonstrated that the IgG2a switch variant of an anti-red blood cell autoantibody had about 20 times more pathogenic potential than the IgG1 switch variant [33], in clear correlation with the different affinities of IgG2a and IgG1 antibodies for Fcγ receptors promoting antibody-dependent cellular cytotoxicity [34] and with the higher capacity of IgG2a antibodies to activate the complement cascade [35]. In addition to the possible differential ability to promote tissue injury, the changes in the levels of circulating IgG1 and IgG2a anti-col II antibodies observed in CD38 KO mice compared to WT mice indirectly reflected a distinct pattern of functional CD4⁺ T cell differentiation between both strains of mice after col II immunization.

Whereas the pathogenic role of Th17 cells in the development of CIA has been clearly defined [36,37], the contribution of Th1 cells is less clear. Thus, IFNα deficiency renders the normally resistant B6 strain susceptible to disease [38,39], and lack of IFNα or signalling through the IFNα receptor enhances the severity of arthritis in susceptible strains such as DBA/1 [40,41]. On the other hand, enhanced Th1 and Th17 immune responses are observed in experimental situations associated to exacerbated CIA, such as in mice with a deficiency of myeloid cell-specific IL-1 receptor antagonist or mice deficient in ApoE lipoprotein [42,43]. In agreement with these last observations, joint expression of IFNα in col II immunized CD38 KO mice is similar to that of non-immunized controls and the induction of Th1 lymphocytes in the draining lymph nodes of these mice is significantly lower than in col II immunized WT mice. The contribution of CD38 to Th1 differentiation has been demonstrated previously. Disruption of CD38/CD31 interaction by soluble CD38 in LPS-stimulated monocyte-derived DC, co-cultured with naive T cells, inhibits the release of IFNα by T cell and impairs Th1 polarization [8]. In addition, the absence of CD38 renders mice more susceptible to *mycobacterial avium* infection secondary to an ineffective Th1 differentiation and polarization, which is essential for the control of *mycobacterial avium* infection [9]. An additional mechanism accounting for the reduced CIA severity in CD38 KO mice is most likely related to the deficient induction of several arthritogenic cytokines in the joints such as IL-1β and IL-6 although the

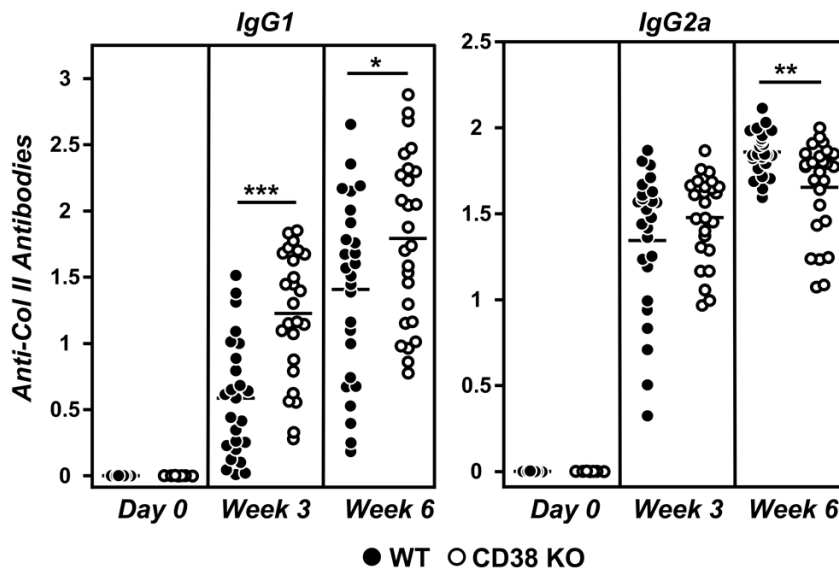


Figure 4. Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-col II antibodies before, 3 and 8 weeks after immunization with col II-CFA. Values of individual mice are expressed. Bars represent the mean value of each examination. Statistic differences are indicated as follow: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0033534.g004

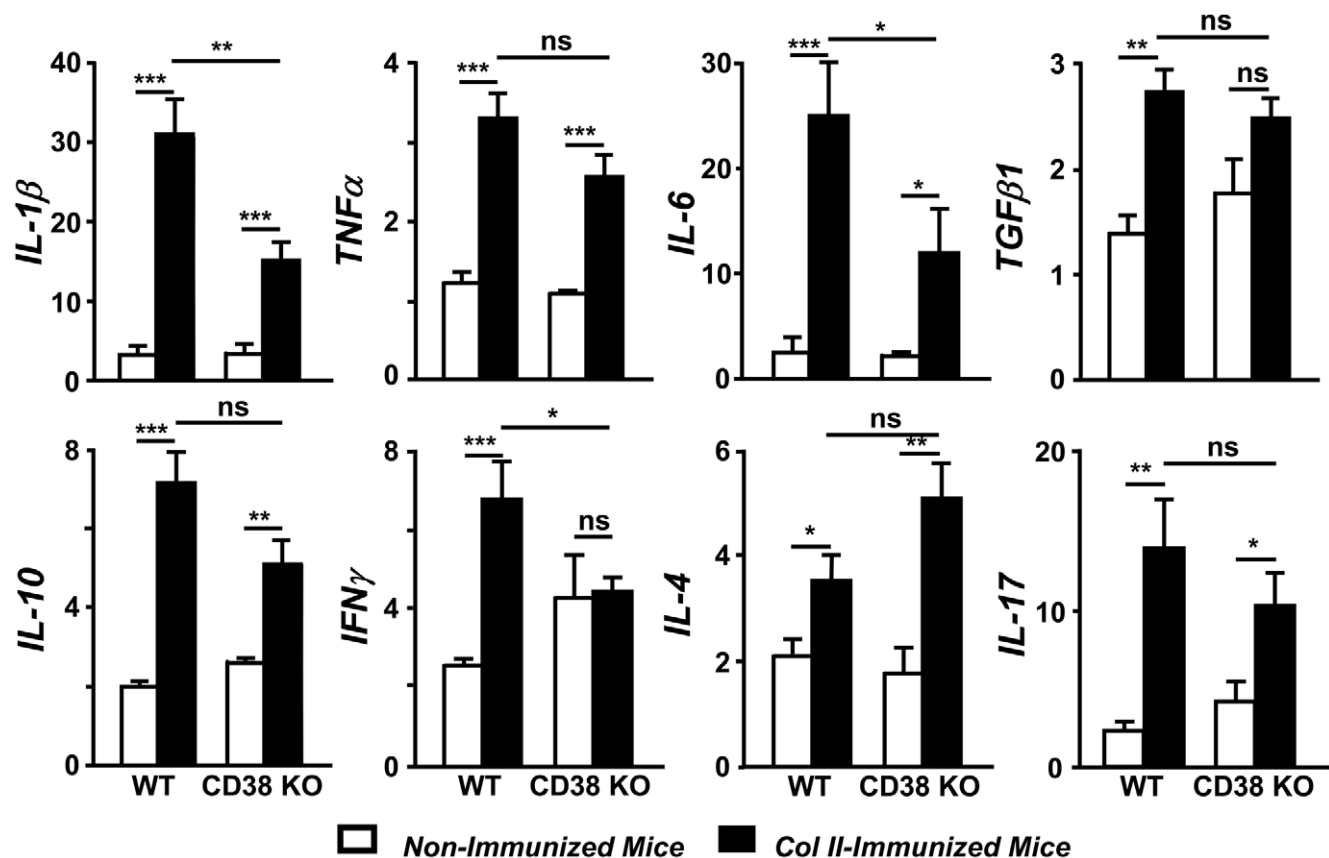


Figure 5. Cytokine expression pattern in the joints of WT and CD38 KO mice during CIA development. Analysis by quantitative real-time RT-PCR of mRNA from different cytokines in the paws of WT and CD38 KO mice, non-immunized (open bars) and 7 weeks after immunization with col II-CFA (closed bars). Results from three independent experiments (15–20 animals/group) are expressed as mean $\pm$ SD fold change of each cytokine relative to GAPDH expression measured in parallel in each sample. Statistic differences are indicated as follow: ns: non-significant, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0033534.g005

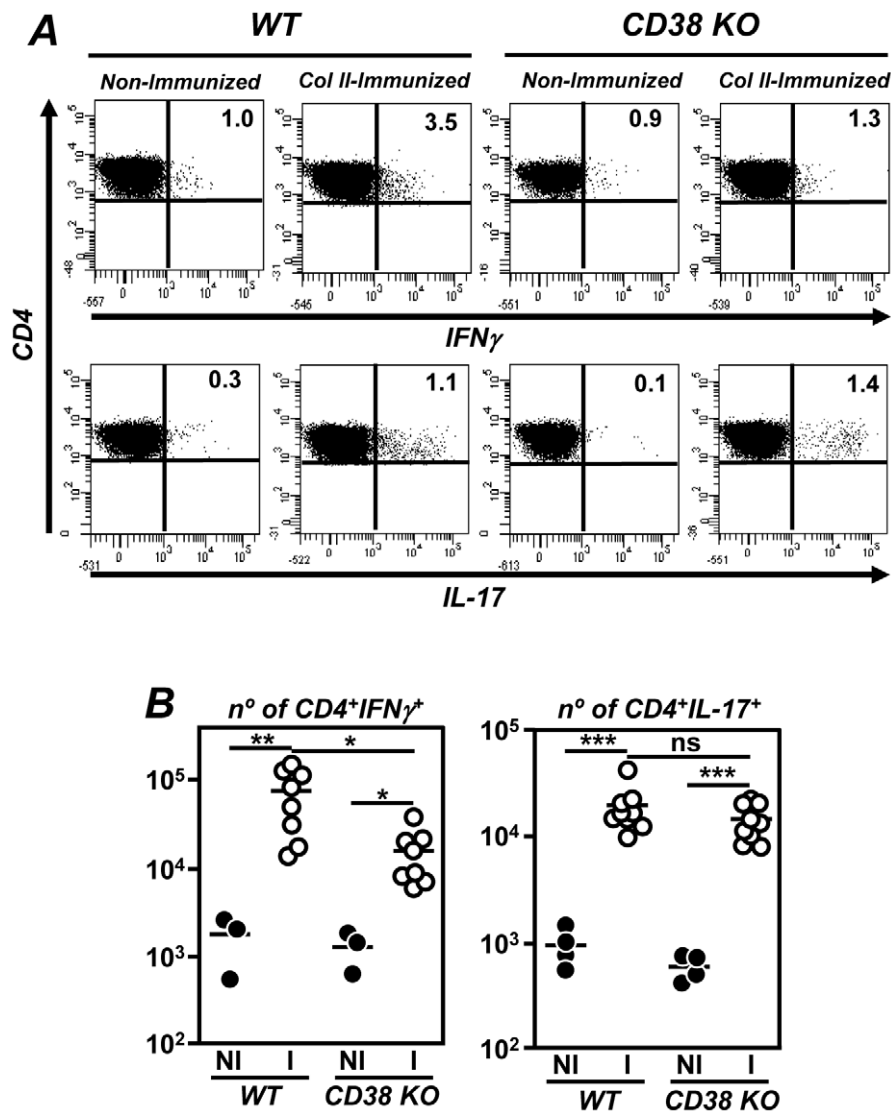


Figure 6. Expansion of Th17 but not Th1 cells in the draining lymph nodes of col II-immunized CD38 KO mice. WT and CD38 KO mice male mice were immunized with col II-CFA. For intracellular cytokine staining, lymphocytes from paraaortic lymph nodes were stimulated 3 weeks after immunization with phorbol myristate acetate and ionomycin in the presence of GolgiStop solution. (A) Representative histograms of CD4⁺IFN γ ⁺ Th1 and CD4⁺IL-17⁺ Th17 cells, determined by flow cytometry, in the different experimental groups. The percentage of each population is indicated. (B) Number of CD4⁺IFN γ ⁺ Th1 (left panel) and CD4⁺IL-17⁺ Th17 (right panel) cells in the draining lymph nodes of non-immunized (NI; ●) and 3 weeks post-immunized (○) mice. Values of individual mice are expressed. Bars represent the mean value of each examination. Statistic differences are indicated as follow: ns: non-significant, *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0033534.g006

joint expression of TNF α is similar in both groups of CIA-developing mice.

All together, the data presented here underline the importance of CD38 in the pathogenesis of CIA probably by increasing the percentages of iNKT cells and by promoting the development of Th1 inflammatory responses. These results can be useful for the design of new therapeutic strategies for rheumatoid arthritis in humans.

Materials and Methods

Ethics Statement

All studies with live animals were approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ILAR, 1985).

Mice

B6 WT mice were purchased from Harlan Iberica (Barcelona, Spain). CD38 KO mice were backcrossed onto the B6 background for more than 12 generations, as described previously [14]. Mice were bled from the retro-orbital plexus 3 and 6 weeks after immunization.

Induction and assessment of arthritis and serological studies

Chicken col II (Sigma, St Louis, MO) was dissolved at a concentration of 2 mg/ml in 0.05 M acetic acid and emulsified with CFA containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* (MD Bioproducts, Zürich, Switzerland). For the induction of CIA, 8–12 weeks-old male mice were immunized once at the base of the tail with 150 μ g of antigen in a final volume of 150 μ l. The *in vivo* depletion of Tregs was

performed using an anti-CD25 mAb (PC61: rat IgG1). Mice received a single injection of 2.5 mg of anti-CD25 mAb or PBS as controls, 4 days prior the immunization with col II. The efficiency of this treatment was evaluated in peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry the one day before immunization. Previous studies showed that this treatment was able to reverse the protection against CIA in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T cells [30]. An evaluation of arthritis severity was performed weekly. Clinical severity was quantified according to a graded scale of 0–3 as follows: 0 = no inflammation (normal joint); 1 = detectable local swelling and/or erythema; 2 = swelling in >1 joint and pronounced inflammation; 3 = swelling of the entire paw and/or ankylosis. Each paw was graded, and the scores were summed (with a maximum possible score 12 per mouse). In addition, the inflammation of the paws was measured at the level of metacarpus and metatarsus 7 weeks after immunization using a digital caliper (Somet CZ, Bilina, Czech Republic).

Radiological studies were performed using a CCX Rx ray source of 70 Kw with an exposition of 90 ms (Trophy Irix X-Ray System; Kodak Spain, Madrid) and Trophy RVG Digital Imaging system as previously described [42]. Radiological images were scale graded according to the presence of 4 different radiological lesions (1: soft tissue swelling, 2: juxtaarticular osteopenia due to alterations in bone density, 3: joint space narrowing or disappearance and 4: bone surface irregularities due to marginal erosions and/or periosteal new bone formation). The extension of every individual lesion in each paw (local: affecting one digit or one joint in the carpus; diffuse: affecting two or more digits and/or two or more joints in the carpus) was graded from 0 to 2 as follow: 0: absence; 1: local; 2: diffuse.

Mice were killed 7 weeks after immunization and the hind paws were fixed in 10% phosphate-buffered formaldehyde solution, decalcified in Parengy's decalcification solution overnight. The tissue was then embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin and examined in a light-phase microscope.

Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-col II antibodies were measured by ELISA as described [44]. The assays were developed with anti-mouse IgG subclass specific antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma). Results were expressed in Absorbance Units at 405 nm.

Flow cytometry studies

According to the route of immunization (the base of the tail), the paraaortic lymph nodes were used as draining lymph nodes [45]. As expected, the size of these draining lymph nodes was greatly enlarged in both groups of mice after immunization with col II-CFA (number of paraaortic lymph node cells in WT mice before: $0.9 \pm 0.2 \times 10^6$, and after immunization with col II-CFA: $5.9 \pm 0.3 \times 10^6$; number of paraaortic lymph node cells in CD38 KO mice before: $1.2 \pm 0.1 \times 10^6$, and after immunization with col II-CFA: $6.3 \pm 0.4 \times 10^6$). The number of Tregs, Th1 and Th17 cells in the draining lymph nodes of WT and CD38 KO mice before and 3 or 7 weeks after immunization with col II-CFA were determined by flow cytometry, as described previously [42]. Briefly, intracellular cytokine staining was performed using an

intracellular staining kit (BD Biosciences). Lymphocytes were stimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in the presence of GolgiStop solution (BD Biosciences) for 6 hours and stained with FITC-conjugated anti-CD4 and PE-conjugated anti-IFN α or PE-conjugated anti-IL-17 (all antibodies from BD Biosciences). A PE-conjugated IgG2a irrelevant antibody was used as an isotype control of cytokine staining. Since in our non-immunized mice iNKT cells were almost undetectable in the paraaortic lymph nodes, the evaluation of iNKT cells was performed in the spleen at different time points after col II immunization. Cells were stained with PE-conjugated CD1d tetramers loaded with α -galactosylceramide (ProImmune, Oxford Science Park, UK) according to the manufacturer guidelines, FITC-conjugated anti-CD3 and allophycocyanin-conjugated CD19. The CD1d restricted iNKT cell population was identified as CD19[−]CD3⁺CD1d-tetramer- α -galactosylceramide⁺ cells. A total of 5×10^4 viable cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences).

Quantitative real-time RT-PCR analyses

Total RNA was obtained from joints by TRIzol extraction (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA). One μ g of the isolated RNA was used for cDNA synthesis with a RT-PCR kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), according to the manufacturer instructions. Quantitative real time RT-PCR was performed on a MX-3000P Stratagene instrument (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) using specific TaqMan expression assays and universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). The following TaqMan expression assays were used in our study: Mm00434228_m1 (IL-1 β), Mm00445259_m1 (IL-4), Mm00446190_m1 (IL-6), Mm00439616_m1 (IL-10), Mm00439619_m1 (IL-17A), Mm00443258_m1 (TNF α), Mm00801778_m1 (IFN α) and Mm00441724_m1 (TGF β). Results (in triplicate) were normalized to *GAPDH* expression and measured in parallel in each sample. Data were expressed as mean fold change relative to control samples.

Statistical analysis

Statistical analysis of differences between groups of mice was performed using the Mann-Whitney and Two-Way Anova test. Probability values <0.05 were considered significant.

Acknowledgments

We thank Dr Frances Lund, University of Rochester Medical School, Rochester, NY, United States for the generous gift of CD38 KO mice and to Maria Aramburu, Natalia Cobo and Iván Gómez for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JP JS JM RM. Performed the experiments: JP MI DC-W AR-V SG-R MZ. Analyzed the data: JP MZ JS JM RM. Contributed reagents/materials/analysis tools: JS JM RM. Wrote the paper: JP JS JM RM.

References

1. Deterre P, Bertheliev V, Bauvois B, Dalloul A, Schuber F, et al. (2000) CD38 in T- and B-cell functions. *Chem Immunol* 75: 146–168.
2. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, et al. (2008) Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 88: 841–886.
3. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, et al. (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262: 1056–1059.
4. Zocchi E, Franco L, Guida L, Benatti U, Bargellesi A, et al. (1993) A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD-glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 1459–1465.
5. Lee HC, Aarhus R (1995) A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *J Biol Chem* 270: 2152–2157.

6. Schubert F, Lund FE (2004) Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: Conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med* 4: 249–261.
7. Deaglio S, Mallone R, Baj G, Arnulfo A, Surico N, et al. (2000) CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem Immunol* 75: 99–120.
8. Frasca L, Fedele G, Deaglio S, Capuano C, Palazzo R, et al. (2006) CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood* 107: 2392–2399.
9. Viegas MS, do Carmo A, Silva T, Seco F, Serra V, et al. (2007) CD38 plays a role in effective containment of mycobacteria within granulomata and polarization of Th1 immune responses against *Mycobacterium avium*. *Microb Infect* 9: 847–854.
10. Munoz P, Mittelbrunn M, de la Fuente H, Perez-Martinez M, Garcia-Perez A, et al. (2008) Antigen-induced clustering of surface CD38 and recruitment of intracellular CD38 to the immunologic synapse. *Blood* 111: 3653–3664.
11. Zubiaur M, Fernandez O, Ferrero E, Salmeron J, Malissen B, et al. (2002) CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/protein kinase B and Erk activation in the absence of the CD3-zeta immune receptor tyrosine-based activation motifs. *J Biol Chem* 277: 13–22.
12. Munoz P, Navarro MD, Pavon EJ, Salmeron J, Malavasi F, et al. (2003) CD38 signaling in T cells is initiated within a subset of membrane rafts containing Lck and the CD3-zeta subunit of the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 278: 50791–50802.
13. Zumaquero E, Munoz P, Cobo M, Lucena G, Pavon EJ, et al. (2010) Exosomes from human lymphoblastoid B cells express enzymatically active CD38 that is associated with signaling complexes containing CD81, Hsc-70 and Lyn. *Exp Cell Res* 316: 2692–2706.
14. Cockayne DA, Muchamuel T, Grimaldi JC, Muller-Steffner H, Randall TD, et al. (1998) Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood* 92: 1324–1333.
15. Partida-Sanchez S, Goodrich S, Kusser K, Oppenheimer N, Randall TD, et al. (2004) Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity* 20: 279–291.
16. Partida-Sanchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, et al. (2001) Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med* 7: 1209–1216.
17. Chen J, Chen YG, Reifsnnyder PC, Schott WH, Lee CH, et al. (2006) Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-ribosyltransferase 2-dependent fashion. *J Immunol* 176: 4590–4599.
18. Chen YG, Chen J, Osborne MA, Chapman HD, Besra GS, et al. (2006) CD38 is required for the peripheral survival of immunotolerogenic CD4⁺ invariant NK T cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 177: 2939–2947.
19. Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, et al. (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART-2 activates the cytolytic P2X7 purinoreceptor. *Immunity* 19: 571–582.
20. Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S (2005) The involvement of V(alpha)14 natural killer T cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. *Arthritis Rheum* 52: 1941–1948.
21. Yoshiga Y, Goto D, Segawa S, Ohnishi Y, Matsumoto I, et al. (2008) Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 response in collagen-induced arthritis. *Int J Mol Med* 22: 369–374.
22. Driver JP, Scheuplein F, Chen YG, Grier AE, Wilson SB, et al. (2010) Invariant natural killer T-cell control of type 1 diabetes: a dendritic cell genetic decision of a silver bullet or Russian roulette. *Diabetes* 59: 423–432.
23. Choe CU, Lardong K, Gelderblom M, Ludewig P, Leyboldt F, et al. (2011) CD38 exacerbates focal cytokine production, postischemic inflammation and brain injury after focal cerebral ischemia. *PLoS One* 6: e19046.
24. Lund FE (2006) Signaling properties of CD38 in the mouse immune system: enzyme-dependent and -independent roles in immunity. *Mol Med* 12: 328–333.
25. Guedes AG, Jude JA, Paulin J, Kita H, Lund FE, et al. (2008) Role of CD38 in TNF-alpha-induced airway hyperresponsiveness. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L290–299.
26. Grammer AC, Slota R, Fischer R, Gur H, Girschick H, et al. (2003) Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *J Clin Invest* 112: 1506–1520.
27. Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY (2007) Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 7: 65–70.
28. Kelchtermans H, De Klerck B, Mitera T, Van Balen M, Bullens D, et al. (2005) Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther* 7: R402–415.
29. Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, et al. (2005) The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther* 7: R291–301.
30. González J, Tamayo E, Santiuste I, Marquina R, Buelta L, et al. (2007) CD4⁺CD25⁺ T cell-dependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes. *J Immunol* 178: 2778–2786.
31. Yanaba K, Hamaguchi Y, Venturi GM, Steeber DA, St Clair EW, et al. (2007) B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* 179: 1369–1380.
32. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L (1998) B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 111: 521–526.
33. Fossati-Jimack L, Ioan-Facsinay A, Reininger L, Chicheportiche Y, Watanabe N, et al. (2000) Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antityrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fcγ receptor III. *J Exp Med* 191: 1293–1302.
34. Ravetch JV, Bolland S (2001) IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19: 275–290.
35. Neuberger MS, Rajewsky K (1981) Activation mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* 11: 1012–1016.
36. Lubbers E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, et al. (2004) Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50: 650–659.
37. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, et al. (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203: 2673–2682.
38. Chu CQ, Song Z, Mayton L, Wu B, Wooley PH (2003) IFN-α deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor Vβ6 and Vβ8 in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 62: 983–990.
39. Guede YB, Whittington KB, Clayton JL, Joosten LA, van de Loo FA, et al. (2001) Genetic ablation of interferon-α up-regulates interleukin-1β expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis Rheum* 44: 2413–2424.
40. Manoury-Schwartz B, Chiochia G, Bessis N, Abelsira-Amar O, Batteux F, et al. (1997) High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-α receptors. *J Immunol* 158: 5501–5506.
41. Vermeire K, Heremans H, van de Putte M, Huang S, Billiau A, et al. (1997) Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-α receptor-deficient mice. *J Immunol* 158: 5507–5513.
42. Postigo J, Genre F, Iglesias M, Fernández-Rey M, Buelta L, et al. (2011) Exacerbation of collagen type II-induced arthritis in ApoE deficient mice in association with the expansion of Th1 and Th17 cells. *Arthritis Rheum* 63: 971–980.
43. Lamacchia C, Palmer G, Seemayer C, Talabot-Ayer D, Gabay C (2010) Enhanced Th1 and Th17 responses and arthritis severity in mice with a deficiency of myeloid cell-specific interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 62: 452–462.
44. Griffiths MM, Cremer MA, Harper DS, McCall S, Cannon GW (1992) Immunogenetics of collagen-induced arthritis in rats: both MHC and non-MHC gene products determine the epitope specificity of immune response to bovine and chick type II collagens. *J Immunol* 149: 309–316.
45. Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A (2008) Lymph node mapping in the mouse. *J Immunol Methods* 332: 170–174.

Exacerbation of Type II Collagen–Induced Arthritis in Apolipoprotein E–Deficient Mice in Association With the Expansion of Th1 and Th17 Cells

Jorge Postigo,¹ Fernanda Genre,¹ Marcos Iglesias,² Maigualida Fernández-Rey,¹ Luis Buelta,³ José Carlos Rodríguez-Rey,¹ Jesús Merino,¹ and Ramón Merino⁴

Objective. To explore the bidirectional relationship between the development of rheumatoid arthritis (RA) and atherosclerosis using bovine type II collagen (CII)–immunized B10.RIII apoE^{−/−} mice, a murine model of spontaneous atherosclerosis and collagen-induced arthritis (CIA).

Methods. Male B10.RIII apoE^{−/−} mice and wild-type controls were immunized with 150 μ g of CII emulsified in Freund's complete adjuvant (CFA). The clinical, radiologic, and histopathologic severity of CIA, the levels of circulating IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies, the expression of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the joints, and the percentages of Th1, Th17, and Treg lymphocytes in the draining lymph nodes were evaluated during CIA induction. In addition, the size of atherosclerotic lesions was assessed in these mice 8 weeks after CIA induction.

Results. B10.RIII apoE^{−/−} mice that were immunized with CII and CFA developed an exacerbated CIA that was accompanied by increased joint expression of

multiple proinflammatory cytokines and by the expansion in the draining lymph nodes of Th1 and Th17 cells. In contrast, the size of vascular lesions in B10.RIII apoE^{−/−} mice was not affected by the development of CIA.

Conclusion. Our findings indicate that a deficiency in apolipoprotein E and/or its consequences in cholesterol metabolism act as accelerating factors in autoimmunity by promoting Th1 and Th17 inflammatory responses.

Rheumatoid arthritis (RA), a chronic autoimmune disease that results in joint inflammation and destruction, is associated with an increased risk of cardiovascular disease due to accelerated atherosclerosis (1,2). The inflammatory environment associated with RA, rather than traditional cardiovascular risk factors, has been postulated to be implicated in the accelerated atherosclerosis in these patients (3). In addition, an association between active RA and altered lipid profiles in plasma, manifested by low levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, a high ratio of total cholesterol to HDL cholesterol, and high levels of triglyceride, has been established (4–6). These unfavorable lipid changes may already be present at least 10 years before the onset of RA (7), suggesting their potential involvement in the initiation and/or activity of this systemic autoimmune disease. In fact, HDL not only participates in the reverse transport of cholesterol, promoting cellular cholesterol efflux from peripheral cells to the liver for excretion, but also possesses antiinflammatory properties, including its ability to protect low-density lipoprotein (LDL) from oxidation (8–11). However, the notion of a mechanistic relationship between altered plasma lipid profiles and active RA lacks appropriate experimental evidence in well-defined animal models.

Dr. Genre's work was supported by a predoctoral fellowship from the Instituto Danone, Spain. Dr. J. Merino's work was supported by grant BFU2009-07206 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. Dr. R. Merino's work was supported by grant SAF2008-02042 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain, and the Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, Spain.

¹Jorge Postigo, BS, Fernanda Genre, BS, Maigualida Fernández-Rey, BS, José Carlos Rodríguez-Rey, PhD, Jesús Merino, MD, PhD: Universidad de Cantabria-IFIMAV, Santander, Spain; ²Marcos Iglesias, BS: Universidad de Cantabria-IFIMAV and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria/CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain; ³Luis Buelta, MD, PhD: Universidad de Cantabria, Santander, Spain; ⁴Ramón Merino, MD, PhD: Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria/CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain.

Address correspondence to Ramón Merino, MD, PhD, IBBTEC, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. E-mail: merinor@unican.es.

Submitted for publication July 8, 2010; accepted in revised form December 21, 2010.

Mice deficient in apolipoprotein E (apoE^{-/-} mice) constitute an excellent animal model in which to explore the metabolic and immunologic mechanisms involved in atherosclerosis (12,13). These mice spontaneously develop atherosclerosis in a time- and diet-dependent manner in association with reduced levels of HDL cholesterol and increased levels of total cholesterol and LDL cholesterol in plasma. Immunization of susceptible strains of mice, such as B10.RIII (H-2^r) mice, with bovine type II collagen (CII) emulsified in Freund's complete adjuvant (CFA) results in the development of a destructive inflammatory joint disease resembling human RA (14). Both atherosclerosis in apoE^{-/-} mice and CII-induced arthritis (CIA) in predisposed animals are mediated by a particular functional subpopulation of antigen-driven CD4⁺ cells, termed Th17 cells, that produce interleukin-6 (IL-6), IL-17A, and IL-21 cytokines (15–19). In fact, blockade of IL-17A results in reduced atherosclerosis in apoE^{-/-} mice, and animals with impaired Th17 differentiation develop an attenuated form of CIA (13,17,18).

In the present study, we used B10.RIII apoE^{-/-} mice immunized with bovine CII and CFA to investigate whether the proinflammatory and/or metabolic alterations that are involved in the pathogenesis of each process separately collaborate in promoting an accelerated atherosclerosis and/or arthritis. Unlike the results of a recent study of C57BL/6 apoE^{-/-} (B6.apoE^{-/-}) mice immunized with chicken CII and CFA (20), our results demonstrated that B10.RIII apoE^{-/-} mice develop accelerated and exacerbated CIA after immunization with CII and CFA. This enhanced severity was accompanied by increased expression of multiple proinflammatory cytokines in mouse joints and by the expansion of Th1 and Th17 cells in the draining lymph nodes. In contrast, the intensity of vascular lesions in B10.RIII apoE^{-/-} mice immunized with CII and CFA was not affected by the development of CIA.

MATERIALS AND METHODS

Mice. B6.apoE^{-/-} (H-2^b) and B10.RIII (H-2^r) mice were purchased from Charles River and Harlan Iberica, respectively. B10.RIII apoE^{-/-} mice were generated in our animal facilities by backcrossing B6.apoE^{-/-} mice with B10.RIII mice for 10 generations. At the second backcross generation, H-2^{r/r} mice were selected by flow cytometry using specific monoclonal antibodies (mAb) against H-2^b and H-2^r (BD Biosciences). At the tenth backcross generation, male and female B10.RIII apoE^{+/-} mice were intercrossed, and the resulting apoE^{-/-} homozygous mice were selected by polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA extracted from mouse tails. Mice were fed a normal chow diet ad libitum and

were bled from the retroorbital plexus 8 weeks after immunization. All experiments with live animals were approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee.

Induction and assessment of arthritis. Bovine CII (provided by Dr. Marie Griffiths, University of Utah, Salt Lake City, UT) was dissolved at a concentration of 2 mg/ml in 0.05M acetic acid and emulsified with CFA containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* (MD Bioproducts). For the induction of CIA, 8–12-week-old male mice were immunized once at the base of the tail with 150 µg of antigen in a final volume of 150 µl. In some experiments, mice injected with phosphate buffered saline (PBS) and CFA were used as CIA-negative controls. A clinical evaluation of arthritis severity was performed as described previously (21).

Radiologic studies were performed using a CCX x-ray source of 70 kV, with an exposure time of 90 msec (Trophy Irix X-Ray System; Kodak Spain) and Trophy RVG Digital Imaging System, as previously described (21). Radiologic images were graded for the presence of the following 4 different radiologic lesions: soft tissue swelling, juxtaarticular osteopenia due to alterations in bone density, joint space narrowing or disappearance, and bone surface irregularities due to marginal erosions and/or periosteal new bone formation. The extent of each individual lesion in each paw was graded on a scale of 0–2, where 0 = absent, 1 = local (affecting 1 digit or 1 joint in the carpus), and 2 = diffuse (affecting ≥2 digits and/or ≥2 joints in the carpus).

Mice were killed 8 weeks after immunization, and the hind paws were fixed in 10% phosphate buffered formaldehyde solution and decalcified overnight in Parengy's decalcification solution. The tissue was then embedded in paraffin. Sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E), examined under a light phase microscope, and scored on a scale of 0–3 as described previously (22).

Serologic analysis. Levels of total cholesterol, HDL cholesterol, LDL and very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol combined, and triglycerides in mouse serum samples were determined using enzymatic assays (cholesterol assay kit [BioVision] and Triglyceride-LQ assay [Spinreact]) according to the recommendations of the manufacturer. Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously described (23). Results were expressed in titration units in reference to a standard curve obtained from a serum pool from CII-CFA-immunized DBA/1 mice. Serum levels of total IgG1 and IgG2a were determined by ELISA as previously described (24). Results were expressed in mg/ml in reference to a standard curve obtained with a mouse reference serum (MP Biomedicals).

Flow cytometric analysis. The percentages of Th1 and Th17 cells in the draining lymph nodes of B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice before and 3 weeks after immunization with CII-CFA were determined by flow cytometry. Intracellular cytokine staining was performed using an intracellular staining kit (BD Biosciences). Lymphocytes from paraaortic lymph nodes were stimulated for 6 hours with phorbol myristate acetate (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in the presence of GolgiStop solution (BD Biosciences) and stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-interferon-γ

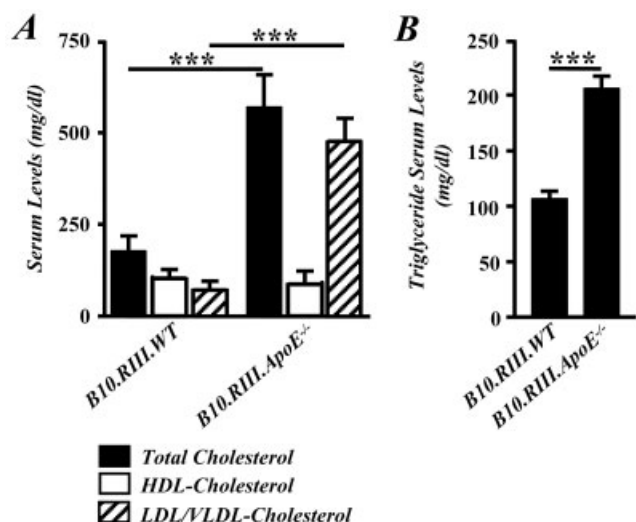


Figure 1. Serum lipid profiles in B10.RIII apoE^{-/-} mice during development of collagen-induced arthritis (CIA). Levels of **A**, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and the combination of low-density lipoprotein (LDL) and very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol and **B**, triglycerides in the sera of male B10.RIII wild-type (WT) and B10.RIII apoE^{-/-} mice were determined 8 weeks after induction of CIA. The lower limit of detection was 0.5 mg/dl in both **A** and **B**. Representative results from 3 independent experiments are shown. Values are the mean $\pm$ SD (n = 8–10 animals per group). *** = $P < 0.001$.

(anti-IFN γ) or PE-conjugated anti-IL-17 (all antibodies from BD Biosciences). A PE-conjugated IgG2a irrelevant antibody was used as an isotype control for cytokine staining. The percentages of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells were determined at the same time points by flow cytometry using conjugated mAb, as described previously (21). A total of 5×10^4 viable cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences).

Real-time quantitative reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) analyses. Total RNA was obtained from mouse joints by TRIzol extraction (Invitrogen Life Technologies). One microgram of the isolated RNA was used for complementary DNA synthesis using an RT-PCR kit according to the recommendations of the manufacturer (Amersham Pharmacia Biotech). Real-time quantitative RT-PCR was performed on an MX-3000P Stratagene instrument (Agilent Technologies) using specific TaqMan expression assays and universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Life Technologies). Results (in triplicate) were normalized to GAPDH expression and measured in parallel in each sample. Data were expressed as the mean fold change relative to control samples.

Evaluation of atherosclerosis. The extent of atherosclerosis was quantified as previously described (25). Briefly, 8–10 sections (5 μ m) obtained at 50- μ m intervals from paraffin-embedded aortic sinus of PBS-CFA-immunized and CII-CFA-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice were stained with H&E. Lesion size was determined by computer-assisted morphometry and expressed as the percentage of the surface area of the aorta occupied by lesions according to the following

formula: $(\Sigma \text{ area of lesion} / \Sigma \text{ total internal perimeter of the aorta}) \times 100$. For cellular characterization of atherosclerotic lesions, macrophages were detected by immunohistochemistry using a biotin-labeled rat anti-Mac2 mAb (clone M3/38; Cedarlane Laboratories), followed by streptavidin–horseradish peroxidase (BD Biosciences), and diaminobenzidine substrate (Dako Diagnostics). Specimens were counterstained with hematoxylin. Staining with anti-Mac-2 was expressed as the percentage of stained surface area within the lesions (anti-Mac-2–stained surface/total lesion surface $\times 100$), as previously described (26).

Statistical analysis. Statistical analysis of the differences between groups of mice was performed by Mann-Whitney test. P values less than 0.05 were considered significant.

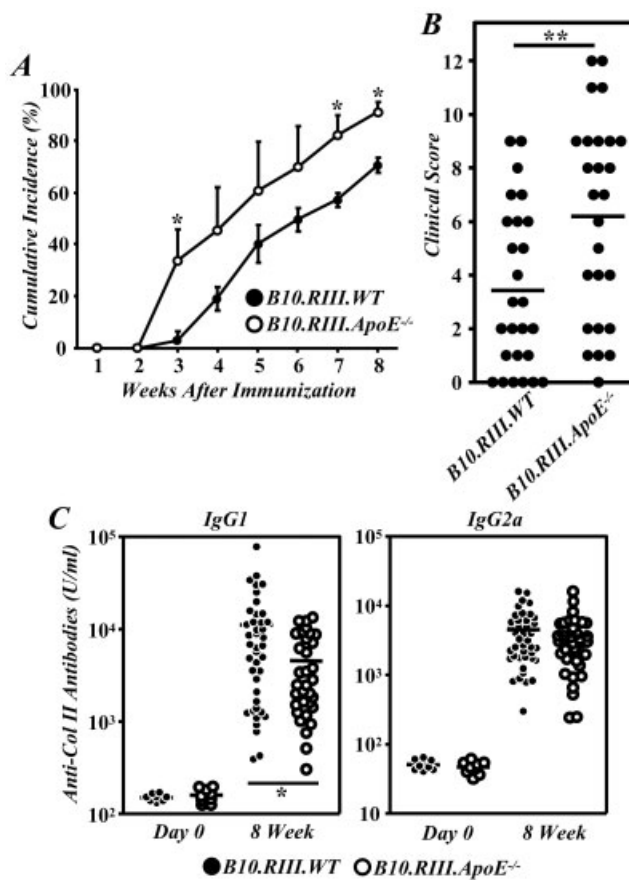


Figure 2. Exacerbated clinical signs and altered anti-type II collagen (anti-Col II [anti-CII]) antibody responses in B10.RIII apoE^{-/-} mice developing collagen-induced arthritis (CIA). Male B10.RIII wild-type (WT) and B10.RIII apoE^{-/-} mice (8–12 weeks old) were immunized with CII and Freund's complete adjuvant (CFA). **A**, Cumulative incidence of CIA. Values are the mean $\pm$ SD percentage of affected mice at the indicated week after immunization (n = 26 mice per group). **B**, Clinical severity of CIA 8 weeks after immunization with CII-CFA. **C**, Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies before and 8 weeks after immunization with CII-CFA. In **B** and **C**, circles represent individual mice and horizontal lines represent the mean. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$.

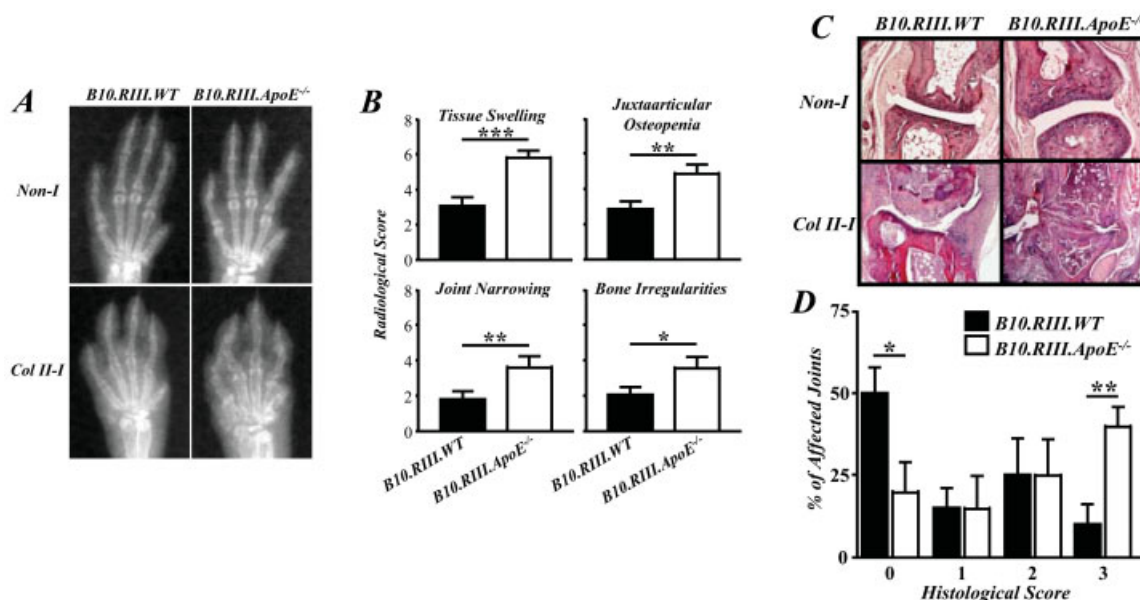


Figure 3. Exacerbated radiologic and histopathologic lesions in B10.RIII apoE^{-/-} mice during development of CIA. Male B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice (8–12 weeks old) were immunized with CII and CFA. **A**, Representative radiologic images of the front paws of nonimmunized (non-I) B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice and B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII-CFA (Col II-I). **B**, Scores for 4 individual radiologic signs in B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice. Representative results from 3 independent experiments are shown. Values are the mean ± SD (n = 20–25 animals per group). **C**, Histologic sections of the joints of representative nonimmunized B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice and B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII-CFA. Original magnification × 10. **D**, Histologic score in the joints 8 weeks after immunization with CII-CFA. Representative results from 3 independent experiments are shown. Values are the mean ± SD percentage of joints in each severity group (n = 20–25 animals per group). * = *P* < 0.05; ** = *P* < 0.01; *** = *P* < 0.005. See Figure 2 for other definitions.

RESULTS

Development of severe CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice. To explore whether the deficiency in apoE influenced the clinical progression of CIA in B10.RIII mice, we immunized B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice with CII-CFA. We first analyzed serum lipid profiles in these groups of mice 8 weeks after immunization. As expected (13), immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice had higher circulating levels of total cholesterol and triglycerides than B10.RIII wild-type mice (*P* < 0.001) (Figures 1A and B). The elevated cholesterol levels in these mice were basically due to the increase in the LDL and VLDL cholesterol fraction, since the levels of serum HDL cholesterol were essentially identical in both groups of mice (Figure 1). The circulating lipid profiles detected in B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII-CFA were similar to those observed before immunization (data not shown). Based on these results and to avoid additional metabolic alterations introduced

by hypercholesterolemic diets, we decided to perform all of the experiments in mice fed a normal chow diet.

We next compared the development of CIA in B10.RIII wild-type mice with that in B10.RIII apoE^{-/-} mice. Unlike findings described in previous reports (20), we found that B10.RIII apoE^{-/-} mice developed more accelerated CIA than B10.RIII wild-type mice and exhibited an increased cumulative incidence throughout the 8-week period of observation (Figure 2A). In addition, the clinical severity of CIA 8 weeks after CII-CFA immunization was significantly higher in B10.RIII apoE^{-/-} mice than in B10.RIII wild-type mice (Figure 2B). Consistent with the clinical findings, the severity of each radiologic sign considered in the present study (soft tissue swelling, juxtaarticular osteopenia, narrowing or disappearance of the interosseous spaces reflecting cartilage loss, and bone irregularities secondary to periosteal new bone formation and/or marginal articular erosions) was significantly higher in B10.RIII

apoE^{-/-} mice than in B10.RIII wild-type mice (Figures 3A and B). In histologic analyses, joints from B10.RIII apoE^{-/-} mice more frequently showed signs of severe autoimmune arthritis, such as widespread infiltration of inflammatory cells, pannus formation, cartilage destruction, and bone erosion (Figures 3C and D).

Altered anti-CII antibody production in B10.RIII apoE^{-/-} mice. The intensity and quality of anti-CII humoral immune responses in B10.RIII wild-type mice was compared with that in B10.RIII apoE^{-/-} mice by analyzing the levels of circulating IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies. Both groups of mice exhibited strong anti-CII antibody responses 8 weeks after CIA induction (Figure 2C). However, qualitative differences in these antibody responses were observed between B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice. Thus, whereas serum levels of IgG2a anti-CII antibodies were similar in both groups of mice, the titers of IgG1 anti-CII antibodies were significantly reduced in B10.RIII apoE^{-/-} mice (Figure 2C). The altered anti-CII humoral immune response was antigen specific, since the

levels of circulating total IgG1 and IgG2a antibodies 8 weeks after CIA induction were similar in B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice (mean $\pm$ SD serum levels of total IgG1 antibodies 0.9 ± 0.4 mg/ml in B10.RIII wild-type mice and 1.1 ± 0.3 mg/ml in B10.RIII apoE^{-/-} mice; mean $\pm$ SD serum levels of total IgG2a antibodies 3.6 ± 1.1 mg/ml in B10.RIII wild-type mice and 3.1 ± 1.7 mg/ml in B10.RIII apoE^{-/-} mice; $P > 0.5$ for both comparisons).

Increased expression of proinflammatory cytokines in the joints and expansion of Th1 and Th17 cells in B10.RIII apoE^{-/-} mice. The exacerbated development of CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice, together with the reduction in the levels of circulating IgG1 anti-CII antibodies compared with B10.RIII wild-type mice, prompted us to explore by real-time quantitative RT-PCR the pattern of cytokine expression in the joints during the induction of CIA in these strains of mice. As expected (27), a significant increase in the expression of the arthritogenic IL-1 β , tumor necrosis factor α (TNF α), and IL-6 transcripts was observed in the joints of B10.RIII wild-type mice 8 weeks after immunization

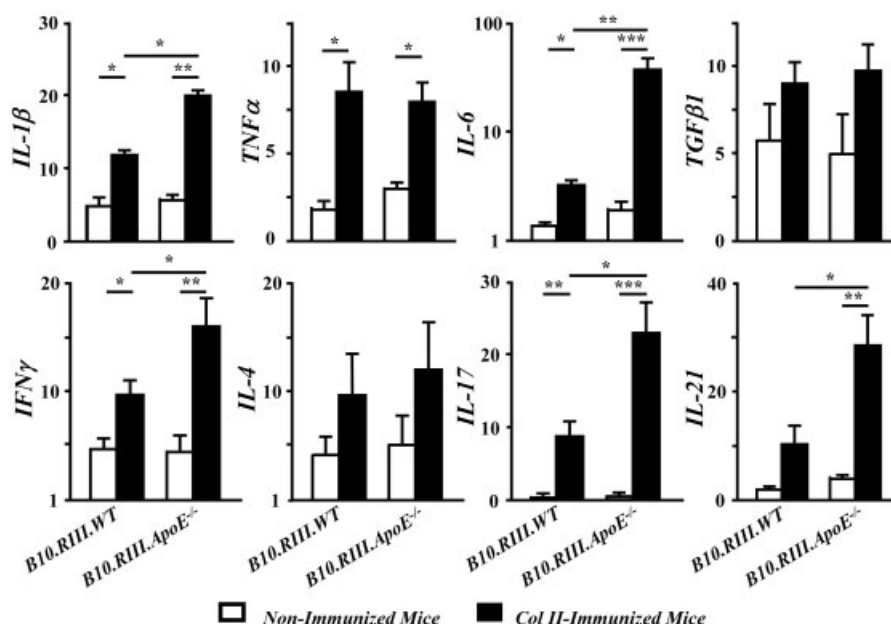


Figure 4. Increased expression of proinflammatory cytokines in the joints of B10.RIII apoE^{-/-} mice during development of CIA. Levels of mRNA for interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF α), IL-6, transforming growth factor β 1 (TGF β 1), interferon- γ (IFN γ), IL-4, IL-17, and IL-21 in the paws of nonimmunized B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice and B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII-CFA were analyzed by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Results are from 3 independent experiments. Values are the mean $\pm$ SD fold change in each cytokine level relative to GAPDH expression measured in parallel in each sample ($n = 15$ – 20 animals per group). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.005$. See Figure 2 for other definitions.

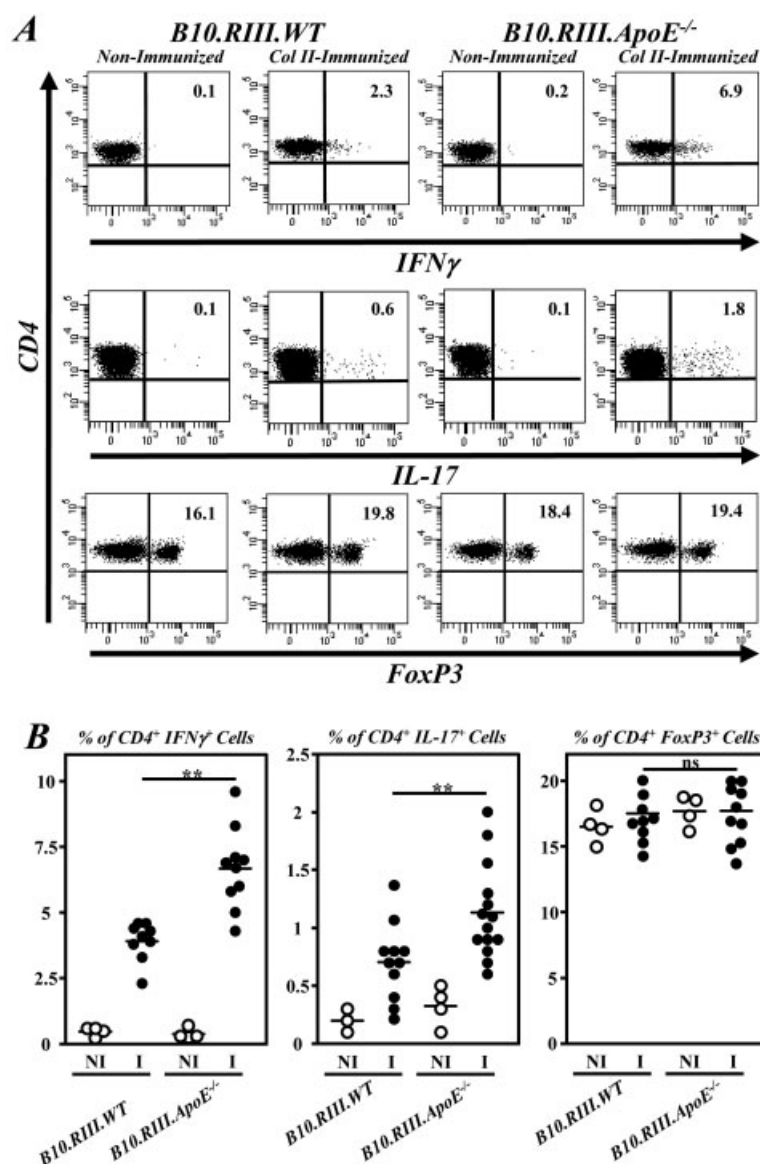


Figure 5. Expansion of Th1 and Th17, but not Treg, cells in the draining lymph nodes of CII-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice. Male B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice (8–12 weeks old) were immunized with CII and CFA. For intracellular cytokine staining, lymphocytes from paraaortic lymph nodes were stimulated 3 weeks after immunization with phorbol myristate acetate and ionomycin in the presence of GolgiStop solution. **A**, Representative histograms of CD4⁺IFN γ ⁺ Th1, CD4⁺IL-17⁺ Th17, and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells in the indicated groups, as determined by flow cytometry. Values are the percentage of cells. **B**, Percentages of CD4⁺IFN γ ⁺ Th1 (left), CD4⁺IL-17⁺ Th17 (middle), and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg (right) cells in nonimmunized mice (NI) and mice 3 weeks after immunization (I). No differences in the number of total lymph node cells were observed between nonimmunized and CII-immunized mice within each group (B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice). Circles represent individual mice; horizontal lines represent the mean. ** = $P < 0.01$. NS = not significant (see Figure 2 for other definitions).

with CII-CFA (Figure 4). In addition, levels of messenger RNA (mRNA) for IFN γ and IL-17, but not transforming growth factor β 1 (TGF β 1), IL-4, or IL-21, in the joint were augmented in B10.RIII wild-type mice with arthritis (Figure 4). In parallel with the aggravated CIA,

the expression of IL-1 β , IL-6, IFN γ , IL-17, and IL-21 transcripts, but not TNF α , TGF β 1, or IL-4, in the joints of CII-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice was even higher than that found in B10.RIII wild-type mice that were developing CIA (Figure 4).

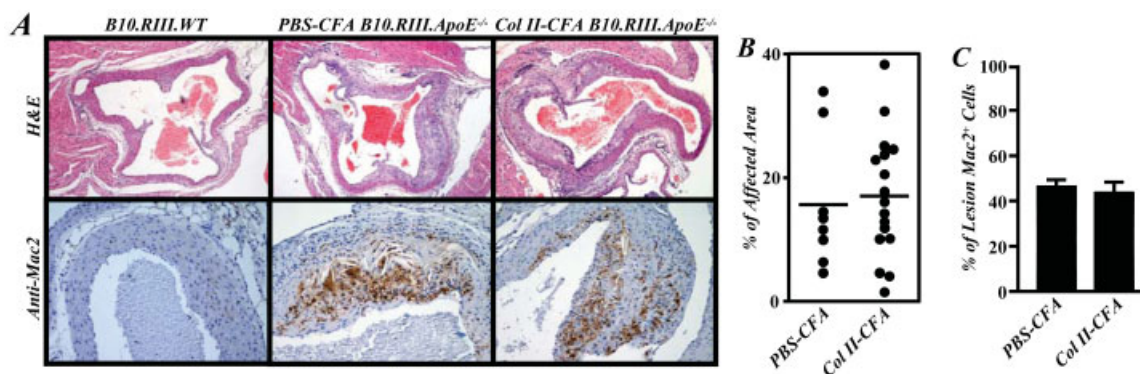


Figure 6. Lack of exacerbation of atherosclerosis by CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice. **A**, Representative histologic sections of the aortic sinus stained with hematoxylin and eosin (H&E), and of atherosclerotic lesions stained for the presence of Mac-2-immunoreactive macrophages, from age-matched untreated B10.RIII wild-type mice, B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with phosphate buffered saline (PBS) and CFA, and B10.RIII apoE^{-/-} mice 8 weeks after immunization with CII and CFA. Original magnification $\times 10$ in top panels and $\times 20$ in bottom panels. **B**, Percentage of area affected in the indicated group, as determined by computer-assisted morphometry. Results are from 2 independent experiments. Circles represent individual mice; horizontal lines show the mean. **C**, Percentage of macrophages in lesions, as determined by immunohistochemistry using an anti-Mac2 monoclonal antibody. Representative results of 2 independent experiments are shown. Values are the mean $\pm$ SD percentages of stained area relative to the area occupied by atheroma ($n = 5$ animals per group). See Figure 2 for other definitions.

Because of the pattern of cytokine expression in the joints and to further explore the mechanisms implicated in the worsening of CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice, we compared the percentages of different functional CD4⁺ T cell subpopulations in the draining lymph nodes of B10.RIII wild-type mice with those in B10.RIII apoE^{-/-} mice before and after immunization with CII-CFA. Both IFN γ -producing Th1 and IL-17-producing Th17 cell populations were augmented in paraaortic lymph nodes from B10.RIII wild-type mice 3 weeks after immunization with CII-CFA (Figure 5). Again, this increase was significantly higher (~ 2 fold) in B10.RIII apoE^{-/-} mice (Figure 5). No differences in the percentage of Treg cells were observed between nonimmunized and immunized B10.RIII wild-type and B10.RIII apoE^{-/-} mice (Figure 5).

Lack of exacerbation of atherosclerosis in B10.RIII apoE^{-/-} mice developing CIA. We next investigated whether the development of severe CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice might in turn modify the clinical evolution of atherosclerosis in these mutant mice. Since adjuvants, including CFA, have potent atheromodulating capabilities in apoE^{-/-} mice (25), B10.RIII apoE^{-/-} mice injected in the base of the tail with only PBS emulsified in CFA were used as CIA-negative controls. As expected, these mice failed to develop arthritis (data not shown). Morphometric studies of the aortic sinus 8 weeks after immunization revealed that the extent of the

atherosclerotic area in CII-CFA-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice was similar to that in PBS-CFA-treated B10.RIII apoE^{-/-} controls ($P > 0.6$) (Figures 6A and B). In addition, similar Mac-2-immunoreactive macrophage content was observed by immunohistochemistry in the atherosclerotic lesions of PBS-CFA-treated and CII-CFA-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice ($P > 0.5$) (Figures 6A and C).

DISCUSSION

In the present study, we explored the bidirectional relationship between RA and atherosclerosis development using an experimental mouse model. We demonstrated that deficiency in apoE and/or its consequences in cholesterol metabolism promote an accelerated and aggravated form of CIA in predisposed B10.RIII mice. The exacerbated CIA is accompanied by increased expression of multiple proinflammatory cytokines in the joints and by the expansion in the draining lymph nodes of Th1 and Th17 cell populations. However, the evolution of atherosclerosis in these B10.RIII apoE^{-/-} mice seems to be unchanged by the development of CIA. Our results clearly contrast with the findings of a recent study showing a resistance to CIA development in apoE-deficient mice (20). Although the reasons for these discrepancies are not clear, they may be related to the use of different CIA models that may

involve immunologic mechanisms that do not completely overlap. While H-2^f CIA-susceptible B10.RIII mice immunized with bovine CII were used in the present study, the previous study was performed with B6 (H-2^b) mice immunized with chicken CII, in which CIA develops with a lower incidence and severity (18,28).

Several mechanisms, which are not mutually exclusive, may explain the exacerbation of CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice. ApoE-containing lipoproteins are very efficient at suppressing the mitogen-induced proliferative responses of lymphocytes (29). In CD4⁺ and CD8⁺ T cells, this effect seems to be, at least in part, dependent on the decrease in the production of biologically active IL-2 (29). Furthermore, the intravenous administration of a small apoE mimetic peptide derived from the receptor binding region of the apoE holoprotein has been shown to suppress both systemic and brain inflammatory responses in mice after lipopolysaccharide administration (30). The antiinflammatory capacity of apoE appears to be isoform dependent, and in the above-mentioned experimental models of brain inflammation, animals expressing the E4 allele have greater inflammatory responses (30). Interestingly, there exists an association between the apoE4 genotype and bone loss in human RA (31). Thus, the enhanced CIA seen in B10.RIII apoE^{-/-} mice may be directly linked with the absence of the antiinflammatory properties of apoE.

On the other hand, apoE deficiency causes important changes in the serum lipid profile of B10.RIII apoE^{-/-} mice, with a notable inversion in the ratio of LDL cholesterol to HDL cholesterol in comparison to B10.RIII wild-type mice. These changes may be relevant for the induction of inflammatory responses, since the immunomodulatory action of HDL consists of inhibiting the expression of proinflammatory rather than antiinflammatory molecules (32) or protecting LDL against oxidation (8–11). In humans, oxidized LDL can be seen as an autoantigen inducing humoral immune responses that may induce cytokine production by macrophages through the activation of complement (33,34). The absence of apoE may also alter the protein composition of either the subclass of HDL with apoE or the entire fraction of serum HDLs, secondary to the induction of inflammatory responses, promoting the generation of HDLs with proinflammatory functions. In a previous study, the levels of proinflammatory HDLs with modified protein content were found to be increased in a cohort of patients with active RA (35). Experiments are in progress to explore such a possibility in B10.RIII apoE^{-/-} mice during CIA development.

The results of previous studies performed in animals that were immunologically depleted or geneti-

cally deficient in B cells underline the importance of humoral immune responses in the induction of CIA (36,37). Notably, B10.RIII apoE^{-/-} mice developing a more severe CIA than B10.RIII wild-type mice exhibited lower serum levels of IgG1, but not IgG2a, anti-CII antibodies. However, it should be stressed that not all antibodies produced in the course of an autoimmune reaction are necessarily pathogenic. In this regard, it has been demonstrated that the IgG2a switch variant of an anti-red blood cell autoantibody is ~20 times more pathogenic than the IgG1 switch variant (38), which is consistent with the different affinities of IgG2a and IgG1 antibodies for Fc γ receptors promoting antibody-dependent cellular cytotoxicity (39). In addition, IgG2a antibodies activate the complement cascade much better than do IgG1 antibodies (40).

Independent of the pathogenicity of IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies in CIA development, the reduction in the levels of circulating IgG1 anti-CII antibodies observed in B10.RIII apoE^{-/-} mice compared to B10.RIII wild-type mice indirectly reflects a distinct pattern of functional CD4 T cell differentiation in each strain of mice after CII immunization. The increased joint expression of the Th1 cytokine IFN γ and the Th17 cytokines IL-17 and IL-21, but not the Th2 cytokine IL-4 or the Treg cytokine TGF β 1, and the expansion of Th1 and Th17 cells, but not Treg cells, in the draining lymph nodes observed in CII-CFA-immunized B10.RIII apoE^{-/-} mice confirm this assumption.

Whereas the pathogenic role of Th17 cells in the development of CIA has been clearly defined (15,16), the contribution of Th1 cells is less clear. Thus, IFN γ deficiency renders the normally resistant B6 strain susceptible to disease (41,42), and lack of IFN γ or signaling through the IFN γ receptor enhances the severity of arthritis in susceptible strains such as DBA/1 mice (43,44). On the other hand, enhanced Th1 and Th17 immune responses are observed in experimental situations associated with exacerbated CIA, such as in mice with a deficiency of myeloid cell-specific IL-1 receptor antagonist (45). Whether the increased joint expression of IFN γ and the expansion of Th1 cells in secondary lymphoid organs play a pathogenic or regulatory role in the development of CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice remains to be determined.

One of the final consequences of the exacerbated CIA in B10.RIII apoE^{-/-} mice was the increase in the expression of multiple proinflammatory and arthritogenic cytokines, such as IL-1 β and IL-6, in the joint. However, despite the enhanced CIA observed in these animals, the expression of TNF α in the joints remained

similar to that in B10.RIII wild-type mice developing CIA. Although these results might appear to be paradoxical, a recent study showed that TNF blockade using TNFR-Fc fusion protein or anti-TNF mAb unexpectedly expanded the populations of Th1 and Th17 cells, which were shown by adoptive transfer to be pathogenic (46). Thus, an additional local increase in the expression of TNF α over the already excessive and pathogenic production of TNF α in RA (47) might play a regulatory role by limiting pathogenic CD4 $^{+}$ T cell responses. Alternatively, since TNF α expression can be regulated at multiple levels including via a posttranscriptional mechanism (48), it might be possible that the production and release of TNF α protein in B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice developing severe CIA was increased in the absence of an up-regulation of TNF α mRNA expression in the joints.

Unlike CIA, the severity of atherosclerosis is not affected by the development of arthritis in CII-CFA-immunized B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice. Thus, the extent of vascular lesions in these CII-CFA-immunized mice is similar to that in PBS-CFA-immunized controls. In addition, similar levels of macrophages were observed in the atherosclerotic lesions of PBS-CFA-treated and CII-CFA-immunized B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice, indicating that the lack of enhanced vascular lesions in CII-CFA-immunized B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice is not related to a preferential migration of inflammatory cells to the affected joints instead of the vessels.

However, it should be noted that adjuvants, including CFA, possess a potent atheroprotective capacity (25) that can mask the potential proatherogenic effect associated with the systemic inflammatory environment found in the animals developing arthritis. Consistent with this possibility and with the findings of previous studies (25), we have observed that the extent of atherosclerosis at the level of the aortic sinus in untreated B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice is significantly higher than that in B10.RIII apoE $^{-/-}$ mice immunized with PBS-CFA, which fail to develop CIA (data not shown). This observation clearly indicates that an experimental model of RA requiring the use of CFA for its induction is not appropriate for studying the cellular and molecular mechanisms responsible for the accelerated atherosclerosis associated with this systemic autoimmune disease.

In conclusion, the results of the present study indicate that a metabolic abnormality associated with dyslipidemia (apoE deficiency) may influence the development of autoimmune diseases such as RA. These findings may be useful in the design of new therapeutic strategies in humans.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Marcos López-Hoyos and Miguel Angel González-Gay (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain) and Dr. Jaime Calvo (Hospital Sierallana, Torrelavega, Spain) for helpful comments on the manuscript and Maria Aramburu, Natalia Cobo, and Iván Gómez for technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Ramón Merino had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Postigo, Rodríguez-Rey, J. Merino, R. Merino.

Acquisition of data. Postigo, Genre, Iglesias, Fernández-Rey, Buelta.

Analysis and interpretation of data. Postigo, Rodríguez-Rey, J. Merino, R. Merino.

REFERENCES

1. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35:8–17.
2. Young A, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough A, Norton S, et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:350–7.
3. Del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 2001;44:2737–45.
4. Choi HK, Seeger JD. Lipid profiles among US elderly with untreated rheumatoid arthritis—the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Rheumatol* 2005;32:2311–6.
5. Park YB, Lee SK, Lee WK, Suh CH, Lee CW, Lee CH, et al. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:1701–4.
6. Yoo WH. Dyslipoproteinemia in patients with active rheumatoid arthritis: effects of disease activity, sex, and menopausal status on lipid profiles. *J Rheumatol* 2004;31:1746–53.
7. Van Halm VP, Nielen MM, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW, Voskuyl AE, et al. Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:184–8.
8. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240:622–30.
9. Hui DY, Harmony JAK, Innerarity TL, Mahley RW. Immunoregulatory plasma lipoproteins. Role of apoprotein E and apoprotein B. *J Biol Chem* 1980;255:11775–81.
10. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 2000;41:1481–94.
11. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 2000;41:1495–508.
12. Daugherty A. Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 2002;323:3–10.
13. Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci* 2001;6:D515–25.
14. Gustafsson K, Karlsson M, Andersson L, Holmdahl R. Structures

- on the I-A molecule predisposing for susceptibility to type II collagen-induced autoimmune arthritis. *Eur J Immunol* 1990;20:2127–31.
15. Xie JJ, Wang J, Tang TT, Chen J, Gao XL, Yuan J, et al. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(–/–) mice. *Cytokine* 2010;49:185–93.
 16. Smith E, Prasad KM, Butcher M, Dobrian A, Kolls JK, Ley K, et al. Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2010;121:1746–55.
 17. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersseelaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 2004;50:650–9.
 18. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006;203:2673–82.
 19. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 2010;140:845–58.
 20. Asquith DL, Miller AM, Hueber AJ, Liew FY, Sattar N, McInnes IB. Apolipoprotein E-deficient mice are resistant to the development of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:472–7.
 21. Gonzalez J, Tamayo E, Santiuste I, Marquina R, Buelta L, Gonzalez-Gay MA, et al. CD4⁺CD25⁺ T cell-dependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes. *J Immunol* 2007;178:2778–86.
 22. Sancho D, Gomez M, Viedma F, Esplugues E, Gordon-Alonso M, Garcia-Lopez MA, et al. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor- β production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 2003;112:872–82.
 23. Lopez-Hoyos M, Marquina R, Tamayo E, Gonzalez-Rojas J, Izui S, Merino R, et al. Defects in the regulation of B cell apoptosis are required for the production of citrullinated peptide autoantibodies in mice. *Arthritis Rheum* 2003;48:2353–61.
 24. Marquina R, Diez MA, Lopez-Hoyos M, Buelta L, Kuroki A, Kikuchi S, et al. Inhibition of B cell death causes the development of an IgA nephropathy in (New Zealand white $\times$ C57BL/6)F(1)-bcl-2 transgenic mice. *J Immunol* 2004;172:7177–85.
 25. Khallou-Laschet J, Tupin E, Caligiuri G, Poirier B, Thiebtemont N, Gaston AT, et al. Atheroprotective effect of adjuvants in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* 2006;184:330–41.
 26. Gonzalez-Navarro H, Abu Nabah YN, Vinue A, Andres-Manzano MJ, Collado M, Serrano M, et al. p19(ARF) deficiency reduces macrophage and vascular smooth muscle cell apoptosis and aggravates atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:2258–68.
 27. Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2007;7:65–70.
 28. Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2^b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2000;30:1568–75.
 29. Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li H-M, Harmony JAK. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogen-activated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. *Cell Immunol* 1994;159:124–39.
 30. Lynch JR, Tang W, Wang H, Vitek MP, Bennett ER, Sullivan PM, et al. APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J Biol Chem* 2003;278:48529–33.
 31. Lee SI, Lee SY, Yoo WH. Association of apolipoprotein E polymorphism with bone mineral density in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1067–8.
 32. Gruaz L, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Dayer JM, Burger D. Blockade of T cell contact-activation of human monocytes by high-density lipoproteins reveals a new pattern of cytokine and inflammatory genes. *PLoS ONE* 2010;5:e9418.
 33. Saad AF, Virella G, Chassereau C, Boackle RJ, Lopes-Virella MF. OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res* 2006;47:1975–83.
 34. Lopes-Virella MF, Virella G. Clinical significance of the humoral immune response to modified LDL. *Clin Immunol* 2010;134:55–65.
 35. Charles-Schoeman C, Watanabe J, Lee YY, Furst DE, Amjadi S, Elashoff D, et al. Abnormal function of high-density lipoprotein is associated with poor disease control and an altered protein cargo in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2870–9.
 36. Yanaba K, Hamaguchi Y, Venturi GM, Steeber DA, St Clair EW, Tedder TF. B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* 2007;179:1369–80.
 37. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1998;111:521–6.
 38. Fossati-Jimack L, Ioan-Facsinay A, Reininger L, Chicheportiche Y, Watanabe N, Saito T, et al. Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fc γ receptor III. *J Exp Med* 2000;191:1293–302.
 39. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19:275–90.
 40. Neuberger MS, Rajewsky K. Activation mouse complement by monoclonal mouse antibodies. *Eur J Immunol* 1981;11:1012–16.
 41. Chu CQ, Song Z, Mayton L, Wu B, Wooley PH. IFN γ deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor V β 6 and V β 8 in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 2003;62:983–90.
 42. Guedez YB, Whittington KB, Clayton JL, Joosten LA, van de Loo FA, van den Berg WB, et al. Genetic ablation of interferon- γ up-regulates interleukin-1 β expression and enables the elicitation of collagen-induced arthritis in a nonsusceptible mouse strain. *Arthritis Rheum* 2001;44:2413–24.
 43. Manoury-Schwartz B, Chiochia G, Bessis N, Abehsira-Amar O, Batteux F, Muller S, et al. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- γ receptors. *J Immunol* 1997;158:5501–6.
 44. Vermeire K, Heremans H, van de Putte M, Huang S, Billiau A, Matthys P. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN- γ receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:5507–13.
 45. Lamacchia C, Palmer G, Seemayer CA, Talbot-Ayer D, Gabay C. Enhanced Th1 and Th17 responses and arthritis severity in mice with a deficiency of myeloid cell-specific interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2010;62:452–62.
 46. Notley CA, Inglis JJ, Alzabin S, McCann FE, McNamee KE, Williams RO. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* 2008;205:2491–7.
 47. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, et al. Treatment with a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor α suppresses disease activity in rheumatoid arthritis: results of a multi-centre, randomised, double blind trial. *Lancet* 1994;344:1105–10.
 48. Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK III. Biology of tumor necrosis factor- α -implications for psoriasis. *Exp Dermatol* 2004;13:193–222.

p27^{Kip1} Inhibits Systemic Autoimmunity Through the Control of Treg Cell Activity and Differentiation

Marcos Iglesias,¹ Jorge Postigo,² Inés Santiuste,¹ Jovanna González,²
Luis Buelta,³ Esther Tamayo,² Jesús Merino,² and Ramón Merino⁴

Objective. Despite the importance of Treg cells in the maintenance of immunologic tolerance, the mechanisms that control their generation and activity are unknown. Since the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} (p27) was involved in T cell anergy, we undertook this study to explore its role in both Treg cell processes.

Methods. The development of type II collagen-induced arthritis (CIA) and lupus-like abnormalities was compared between transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T cells (BCL2-TgT mice) and nontransgenic mice that were deficient or not deficient in p27. The contribution of Treg cells to disease evolution was also explored. Finally, the *in vitro* activity of Treg cells and their differentiation from naive CD4⁺ cells was compared between these strains of mice.

Results. BCL2-TgT mice were protected against CIA by a Treg cell-dependent mechanism. In association with this protection, the overexpression of Bcl-2 in T cells enhanced the differentiation and activity of Treg cells. Both Bcl-2 effects were independent of its antiapoptotic activity but dependent on its capacity to induce the expression of p27 that augmented the

strength of transforming growth factor β (TGF β) signaling in T cells. Accordingly, down-modulation of p27 expression in BCL2-TgT mice promoted CIA. In addition, p27 deficiency in aged C57BL/6 mice reduced the number and activity of Treg cells and induced the development of mild lupus-like abnormalities.

Conclusion. Our results point to p27 as a critical regulator of Treg cell differentiation and function through the positive modulation of TGF β signaling strength in T cells.

Among the cellular populations that control the appropriated activation of immune cells in the periphery, CD4⁺CD25⁺ Treg cells seem to play a dominant role. Severe autoimmune diseases are observed when these cells are absent, as occurs after neonatal thymectomy in mice or in humans and as occurs in mice with mutations or deletions in the FoxP3 gene, a master regulator of Treg cell differentiation and function (1–6). In addition to their role in immunologic tolerance, Treg cells participate in the control of immune responses against pathogens, tumor cells, and allografts (7–10), further supporting the importance of this cell population in the maintenance of immune homeostasis. Although a lot of information has been accumulated about these cells in recent years, our current knowledge of the molecular mechanisms that regulate the number and activity of Treg cells *in vivo* is still scarce and fragmentary.

Transforming growth factor β (TGF β) participates in the conversion of activated CD4⁺ T cells into induced Treg (iTreg) cells and is an important mediator of Treg cell suppressive activity (11,12). In addition, it protects naturally occurring Treg cells against apoptosis, antagonizing T cell negative selection through the regulation of the expression of both pro- and antiapoptotic members of the Bcl-2 gene family (13,14). In this regard, we have recently demonstrated that *hBCL2-Ig*-transgenic mice overexpressing the antiapoptotic protein Bcl-2 in B cells and in a minor fraction of T cells are protected

Supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, to Dr. J. Merino (BFU2009-07206) and Dr. R. Merino (SAF2011-22463, cofunded by the European Regional Development Fund, and SAF2008-02042), the Fundación Eugenio Rodríguez Pascual, Spain, to Dr. R. Merino, and the Fundación Marqués de Valdecilla-Leonardo Torres Quevedo, Spain, to Drs. J. Merino and R. Merino (FMV-UC 08/02).

¹Marcos Iglesias, PhD, Inés Santiuste, PhD: Universidad de Cantabria-IFIMAV, Santander, Spain, and IBBTEC CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain; ²Jorge Postigo, BS, Jovanna González, PhD, Esther Tamayo, PhD, Jesús Merino, MD, PhD: Universidad de Cantabria-IFIMAV, Santander, Spain; ³Luis Buelta, MD, PhD: Universidad de Cantabria, Santander, Spain; ⁴Ramón Merino, MD, PhD: IBBTEC CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain.

Address correspondence to Ramón Merino, MD, PhD, IBBTEC, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain. E-mail: merinor@unican.es.

Submitted for publication February 28, 2012; accepted in revised form October 25, 2012.

against 2 experimental autoimmune diseases: type II collagen-induced arthritis (CIA) and systemic lupus erythematosus (SLE) (15). Such protection is mediated by Treg cells that are increased in these transgenic mice, and their depletion promotes autoimmunity. Other investigators claim that Bcl- x_L is required for the development of Treg cells, which ameliorates lupus following treatment with a human first complementarity-determining region tolerogenic peptide (16). However, the mechanisms by which these antiapoptotic factors affect Treg cell biology have still not been clarified.

Bcl-2 also regulates cell cycle progression, and lymphocytes overexpressing Bcl-2 exhibit a marked delay in cell cycle entry after activation (17,18). This antiproliferative activity of Bcl-2 may be associated, at least in part, with its capacity to induce the expression of p27^{Kip1} (p27), a cell cycle inhibitor, and of p130, a member of the retinoblastoma family of cell cycle regulators (17–19). Remarkably, different studies emphasize the role of p27 in the induction and maintenance of clonal anergy of T lymphocytes observed after inhibition of costimulation (20,21). In view of this evidence, we analyzed in the present study the mechanisms responsible for the protection against autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T cells. We found that the overexpression of Bcl-2 in CD4+ cells increases their differentiation into Treg cells and enhances the suppressive capacity of Treg cells. Both phenomena were mediated by p27 acting as a sensor of TGF β signaling strength. Accordingly, downmodulation of p27 expression abrogated the protection against autoimmunity observed in these transgenic mice. The fact that the activity and number of Treg cells were also reduced in C57BL/6 (B6) mice deficient in p27 indicates that this cell cycle inhibitor is also an essential regulator of Treg cell biology in normal mice.

MATERIALS AND METHODS

Mice. B6 and DBA/1 mice were obtained from Harlan Ibérica. B6.p27^{-/-} and C3H/HeN-*Lck-hBCL2*-transgenic mice (BCL2-TgT mice) (22) were obtained from The Jackson Laboratory. The *Lck-hBCL2* transgene was transferred into B6 mice by backcross procedures to generate B6-BCL2-TgT mice. B6-A1-TgT mice (23) were generously provided by Dr. M. B. Prystowsky (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY). The F₁ hybrids and double-transgenic mice used in this study were obtained in our animal facilities. Genotyping of mice was performed by polymerase chain reaction of genomic tail DNA. All studies with live animals were approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee and carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

Induction of arthritis and treatments. Bovine type II collagen (BII; MD Bioproducts) was emulsified with Freund's complete adjuvant containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* (MD Bioproducts). For the induction of CIA, 8–12-week-old female mice were immunized once at the base of the tail with 150 μ g of antigen. Clinical and radiographic evaluations of arthritis severity were performed as described previously (15,24).

Depletion of Treg cells was performed using an anti-CD25 monoclonal antibody (mAb) (PC61, rat IgG1), as previously described (15). Mice received a single intraperitoneal injection of 2.5 mg of anti-CD25 mAb or phosphate buffered saline (PBS) as a control 4 days prior to immunization with BII. The efficiency of this treatment was evaluated in peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry.

Cell cultures. Treg cells, CD4+CD25- cells, or naive CD4+CD25-CD62L+CD44+ cells from the different mouse strains were purified (>99% purity in all cases) by sorting on a FACSaria (BD Biosciences). Antigen-presenting cells (APCs) were derived from irradiated spleen cells obtained from B6 nontransgenic mice. For the assessment of Treg cell activity, 5×10^4 CD4+CD25- cells were cultured in triplicate for 3 days in complete RPMI 1640 medium and stimulated with 0.5 μ g/ml of anti-CD3 mAb (clone 145-2C11; BD Biosciences) in the presence of 5×10^4 APCs and decreasing ratios of Treg cells. Cultures were pulsed with 1 μ Ci of ³H-thymidine (³H-TdR) for the final 6 hours of culture, harvested, and counted. For the differentiation cultures, 5×10^5 naive CD4+ cells were stimulated for 5 days with plastic-bound anti-CD3 (1 μ g/well) and anti-CD28 (0.5 μ g/well, clone 37.51; BD Biosciences) mAb in the presence of 5 ng/ml of recombinant human TGF β 1 and 1 ng/ml of recombinant human interleukin-2 (IL-2) (PeproTech). The percentage of FoxP3+ cells at the end of the culture period was evaluated by flow cytometry. Purified Treg cells from different mice were cultured in triplicate at a concentration of 10^6 /ml in complete RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum. Cell viability was assessed daily by trypan blue exclusion, as previously described (25). Naive CD4+ cells were stimulated with plastic-bound anti-CD3 mAb for 3–5 days in the presence or absence of different concentrations of recombinant human TGF β 1. Cultures were pulsed with ³H-TdR and counted as described above.

Flow cytometry. The percentages of Treg cells, Th17 cells, and memory CD4+CD62L-CD44+ cells in the spleens of mice at the indicated time points or after in vitro culture were determined by flow cytometry, as was the expression of p27 in CD4+ subpopulations. The following fluorescent dye-labeled antibodies were used: anti-CD4, anti-CD25, anti-CD62L, anti-CD44, and anti-p27 from BD Biosciences, anti-IL-17 and anti-FoxP3 from eBioscience, and anti-Helios from BioLegend. Intracellular cytokine staining was performed using an intracellular staining kit (BD Biosciences), as described previously (24). Cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences).

Serologic studies. Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-BII antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on 96-well plates coated with BII (4 μ g/well), as described previously (26). Results were expressed in absorbance units (AU) at 405 nm. Levels of IgG and IgA anti-DNA autoantibodies were determined in sera by ELISA as described previously (27), and the results were

expressed in titration units in reference to a standard curve obtained from a pool of serum from 6–8-month-old (NZW $\times$ B6)F₁.hBCL2-Ig-transgenic mice.

Histopathology. Mice were killed 8 weeks after immunization, and the legs were fixed in 10% phosphate buffered formaldehyde solution and decalcified in Parengy's decalcification solution overnight. Kidneys from 18-month-old mice were embedded in paraffin, and sections (4 μ m) were stained with hematoxylin and eosin or periodic acid–Schiff and scored as described previously (15). Glomerular-bound IgG and IgA antibodies were studied by immunofluorescence on kidney cryosections as described previously (27).

Statistical analysis. Statistical analysis of differences between groups of mice was performed using the Mann-Whitney test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Overexpression of Bcl-2 in T cells inhibits development of CIA by a Treg cell-dependent mechanism. We recently demonstrated that hBCL2-Ig-transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in B cells and in a

fraction of T lymphocytes were protected against the development of SLE and CIA by a Treg cell-dependent mechanism (15). To further explore this phenomenon, we analyzed the development of CIA in mice generated by crossing B6-BCL2-TgT mice with DBA/1 mice (F₁-BCL2-TgT mice). F₁-BCL2-TgT mice immunized with BII developed a mild CIA in comparison to F₁ nontransgenic mice (Figure 1A). Consistent with the clinical findings, and with the exception of soft tissue swelling, the severity of the radiographic signs analyzed here was highly reduced in F₁-BCL2-TgT mice in comparison to F₁ nontransgenic controls (Figures 1B and C). By histology, the joints of F₁-BCL2-TgT mice did not show signs of severe arthritis like cartilage and bone destruction, synovitis, and pannus formation, which were present in F₁ nontransgenic controls (Figure 1C).

The mean $\pm$ SD levels of IgG1 (serum levels in F₁ nontransgenic mice, 1.054 ± 0.58 AU; in F₁-BCL2-

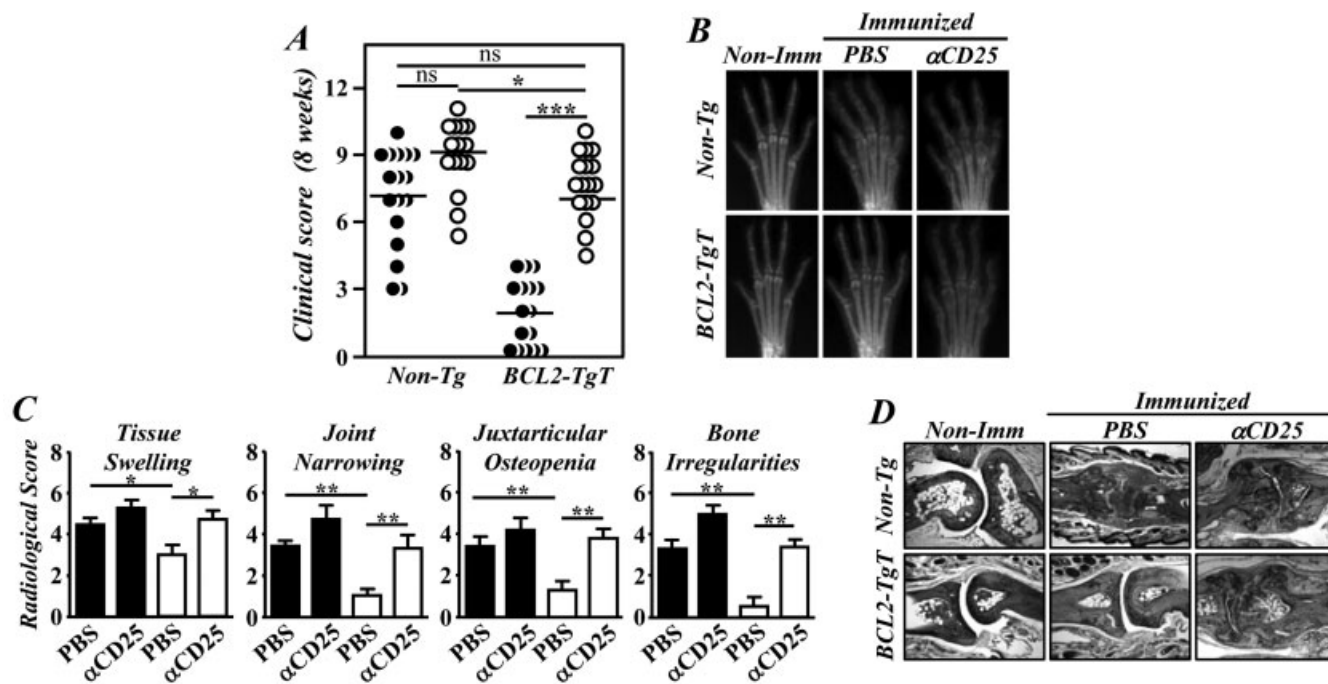


Figure 1. T cell overexpression of Bcl-2 protects mice against the development of collagen-induced arthritis (CIA) by a Treg cell-dependent mechanism. **A**, Clinical severity of CIA 8 weeks after immunization with collagen emulsified with Freund's complete adjuvant (CFA) in phosphate buffered saline (PBS)-treated (solid circles) or anti-CD25-treated (open circles) F₁ nontransgenic (non-Tg) mice and F₁ transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T cells (F₁-BCL2-TgT mice). Clinical scores of individual mice from 3 independent experiments are shown. Horizontal lines represent the mean. **B**, Representative radiographs of the hind paws of PBS-treated or anti-CD25-treated F₁ nontransgenic and F₁-BCL2-TgT mice, before (Non-Imm) and 8 weeks after immunization with collagen emulsified with CFA. **C**, Radiographic score during the development of CIA in F₁ nontransgenic mice (solid bars) and F₁-BCL2-TgT mice (open bars). Values of the 4 individual signs analyzed are the mean $\pm$ SD from the experiments shown in **A** at the eighth week after immunization with collagen emulsified with CFA. **D**, Representative histologic appearance of the joints of PBS-treated or anti-CD25-treated F₁ nontransgenic and F₁-BCL2-TgT mice, before and 8 weeks after immunization with collagen emulsified with CFA. Hematoxylin and eosin stained; original magnification $\times$ 10. * = *P* < 0.05; ** = *P* < 0.01; *** = *P* < 0.001. NS = not significant.

TgT mice, 0.973 ± 0.72 AU) ($P > 0.05$) and IgG2a (serum levels in F_1 nontransgenic mice, 1.558 ± 0.47 AU; in F_1 -BCL2-TgT mice, 1.39 ± 0.42 AU) ($P > 0.05$) anti-BII antibodies were similar in both groups of mice 8 weeks after immunization, suggesting that the absence of CIA in F_1 -BCL2-TgT mice was not associated with a deficient immunization or a possible deviation toward Th1 or Th2 immune responses. The autoimmune protection was mediated by Treg cells, since the depletion of these cells with anti-CD25 mAb promoted the development of CIA in F_1 -BCL2-TgT mice with a severity similar to that with PBS, but with significantly lower severity than in their anti-CD25-treated nontransgenic counterparts (Figure 1A). Although anti-CD25-treated nontransgenic mice also de-

veloped more severe CIA than PBS-treated controls, these differences were not statistically significant ($P = 0.06$) (Figure 1).

Increased in vitro suppressive activity of Treg cells and altered distribution of Treg cell and Th17 cell populations in F_1 -BCL2-TgT mice. We assessed the possible effect of human Bcl-2 overexpression in the in vitro suppressive activity of Treg cells from F_1 -BCL2-TgT mice. The anti-CD3-induced proliferation of effector $CD4^+CD25^-$ cells from both F_1 nontransgenic mice and F_1 -BCL2-TgT mice was efficiently blocked by Treg cells isolated from the spleens of nontransgenic mice in a $CD4^+$ cell:Treg cell ratio-dependent manner (Figure 2A). Interestingly, Treg cells from F_1 -BCL2-TgT mice were 4–5 and 3 times more efficient than Treg cells from

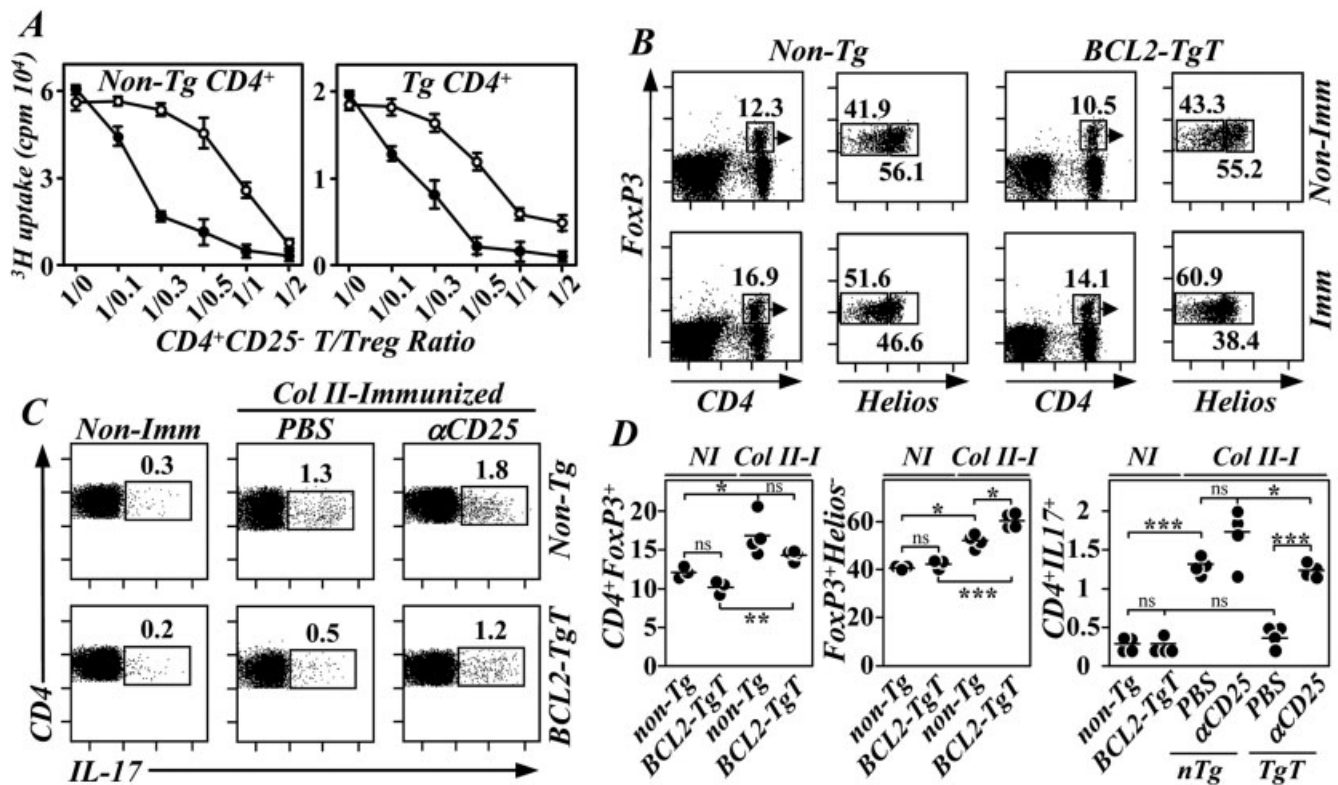


Figure 2. Effects of Bcl-2 overexpression in Treg cell activity and Treg cell/Th17 cell distribution. **A**, $CD4^+CD25^-$ cells from F_1 nontransgenic mice (left) or F_1 -BCL2-TgT mice (right) were stimulated with anti-CD3 and F_1 nontransgenic antigen-presenting cells in the presence of Treg cells from F_1 nontransgenic mice (open circles) or F_1 -BCL2-TgT mice (solid circles) at different $CD4^+CD25^-$ T cell:Treg cell ratios. Values are the mean $\pm$ SD 3H -thymidine incorporation in triplicate cultures and are representative of >5 independent experiments. **B**, Shown are representative dot plots from 3 independent experiments with $CD4^+FoxP3^+$ cells, showing Helios expression within the $CD4^+FoxP3^+$ population (arrowheads) in the spleens of F_1 nontransgenic and F_1 -BCL2-TgT mice, before and 3 weeks after immunization (Imm) with collagen (Col II) emulsified with CFA. **C**, Shown are representative dot plots from at least 2 independent experiments assessing $CD4^+$ interleukin-17-positive (IL-17 $^+$) cells in the spleens of PBS-treated and anti-CD25-treated F_1 nontransgenic and F_1 -BCL2-TgT mice, before and 3 weeks after immunization with collagen emulsified with CFA. Percentages in the gated populations in **B** and **C** are indicated. **D**, Shown are percentages of $CD4^+FoxP3^+$, $CD4^+FoxP3^+Helios^-$, and $CD4^+IL-17^+$ cells in the spleens of mice described in **B** and **C**. Horizontal lines represent the mean. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$. NI = nonimmunized; Col II-I = immunized with collagen; nTg = nontransgenic (see Figure 1 for other definitions).

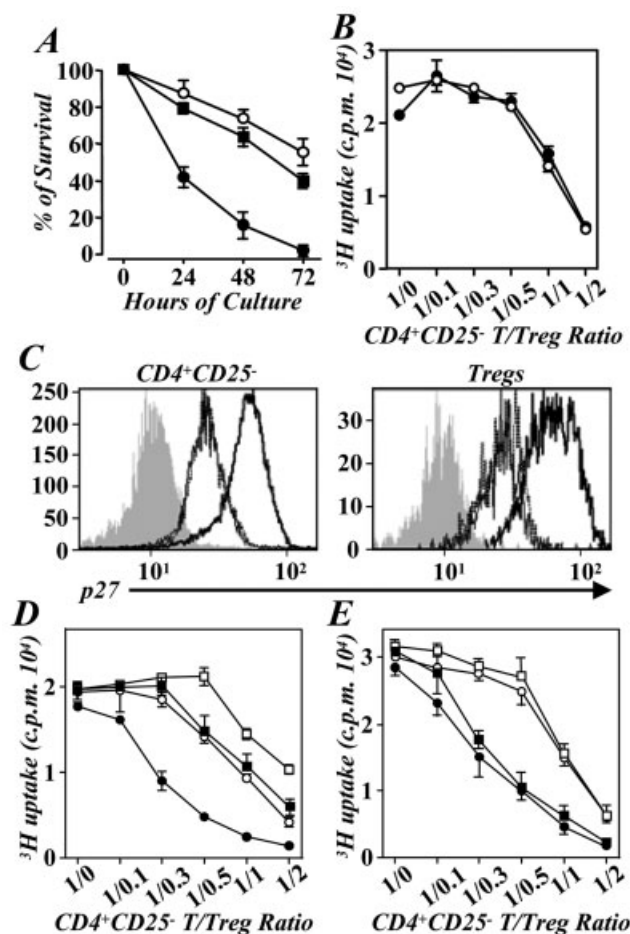


Figure 3. Role of p27^{Kip1} (p27) in the increased in vitro suppressive activity of Treg cells in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T cells (BCL2-TgT mice). **A**, In vitro survival, assessed by trypan blue exclusion, of Treg cells from C57BL/6 (B6) nontransgenic mice (solid circles), B6-BCL2-TgT mice (open circles), and B6-A1-TgT mice (squares) cultured in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum. Values are the mean $\pm$ SD of triplicate cultures from 2 independent experiments. **B**, Suppressive capacity of Treg cells from B6 nontransgenic mice (solid circles) and B6-A1-TgT mice (open circles). **C**, Representative flow cytometry histograms comparing the expression of p27 in CD4⁺CD25⁺ cells and Treg cells between B6 nontransgenic mice (thin lines), B6-A1-TgT mice (dotted lines), and B6-BCL2-TgT mice (thick lines). The expression of p27 in the same populations of B6.p27^{-/-} mice (gray filled histogram) is also shown. **D**, Suppressive capacity of Treg cells from B6 nontransgenic mice (open circles), B6-BCL2-TgT mice (solid circles), B6.p27^{-/-} mice (open squares), and B6-BCL2-TgT.p27^{-/-} mice (solid squares). **E**, Suppressive capacity of Treg cells from B6 nontransgenic mice (open symbols) and B6-BCL2-TgT mice (solid symbols) in the anti-CD3-induced proliferation of CD4⁺CD25⁺ cells from B6.p27^{+/+} mice (circles) and B6.p27^{-/-} mice (squares). Values in **B**, **D**, and **E**, are the mean $\pm$ SD ³H-thymidine incorporation in triplicate cultures and are representative of at least 3 independent experiments.

F₁ nontransgenic mice at inhibiting the proliferation of anti-CD3-stimulated CD4⁺ cells from F₁ nontrans-

genic mice and F₁-BCL2-TgT mice, respectively (Figure 2A).

Our previous studies in *hBCL2-Ig*-transgenic mice showed an expansion in Treg cells within the minor CD4⁺ cell subpopulation overexpressing human Bcl-2 (15). Unlike the case in those transgenic mice, the percentage of total Treg cells in the spleens of nonimmunized F₁-BCL2-TgT mice was similar to that in the spleens of F₁ nontransgenic mice (Figures 2B and D). In both groups of nonimmunized F₁ mice, the distribution of Treg cells among the Helios⁺ and Helios⁻ Treg cell subpopulations was also comparable. Three weeks after BII immunization, the percentages of Treg cells in the spleen increased similarly in both groups of mice (Figures 2B and D). However, the increase in the Helios⁻ Treg cell subpopulation was significantly greater in F₁-BCL2-TgT mice than in F₁ nontransgenic mice.

We then compared the percentages of Th17 cells during the induction of CIA between F₁ nontransgenic mice and F₁-BCL2-TgT mice. None of the IL-17-producing cells detected in the experiments described below were FoxP3⁺, strongly suggesting that they were truly Th17 cells (data not shown). Three weeks after BII immunization, a significant increase in the percentage of Th17 cells was observed in the spleens of PBS-treated F₁ nontransgenic mice (Figures 2C and D). However, such an increase was not observed in PBS-treated F₁-BCL2-TgT mice (Figures 2C and D). Depletion of Treg cells significantly enhanced the percentage of Th17 cells in the spleens of F₁-BCL2-TgT mice at the levels observed in BII-immunized untreated F₁ nontransgenic mice (Figures 2C and D). The increase in Th17 cells was also observed in the spleens of anti-CD25-treated nontransgenic mice in comparison to their untreated controls, although again it did not reach statistical significance (Figures 2C and D).

Involvement of p27 in the increased in vitro suppressive activity of Treg cells in B6-BCL2-TgT mice.

We explored whether the enhanced suppressive capacity of Treg cells from B6-BCL2-TgT mice was due to an increased survival of these cells, secondary to Bcl-2 overexpression. To this end, we compared the suppressive activity of Treg cells from B6 nontransgenic mice with that of Treg cells from B6 mice overexpressing the antiapoptotic protein A1, another antiapoptotic member of the Bcl-2 gene family (28), in T cells (23). Indeed, Treg cells from B6-A1-TgT mice exhibited a prolonged in vitro survival similar to that of Treg cells from B6-BCL2-TgT mice ($P > 0.05$) (Figure 3A). However, despite the increased resistance to cell death, the in vitro suppressive capacity of Treg cells from B6-A1-TgT mice

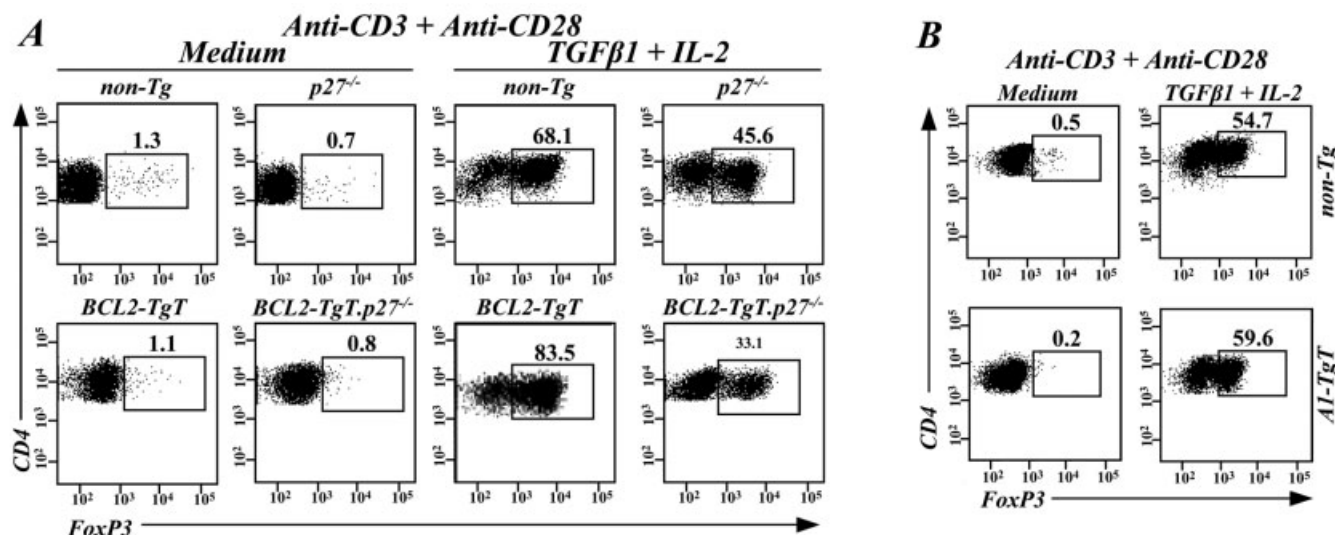


Figure 4. The cell cycle inhibitor p27^{Kip1} (p27) regulates Treg cell differentiation in vitro. **A**, Naive CD4⁺CD25⁻CD62L⁺CD44⁻ T cells from C57BL/6 (B6) nontransgenic mice, B6-BCL2-TgT mice, B6.p27^{-/-} mice, and B6-BCL2-TgT.p27^{-/-} mice were stimulated in vitro with plastic-bound anti-CD3 and anti-CD28 antibodies under Treg cell differentiation conditions (5 ng/ml of recombinant human transforming growth factor β1 [TGFβ1] and 1 ng/ml of recombinant human interleukin-2 [IL-2]). Shown are representative dot plots from at least 6 independent experiments with CD4⁺FoxP3⁺ cells after 5 days of culture. Percentages in the gated populations are indicated. **B**, Naive CD4⁺ cells from B6 nontransgenic mice and B6-A1-TgT mice were stimulated in vitro under Treg cell differentiation conditions as indicated above. Shown are representative dot plots from at least 3 independent experiments with CD4⁺FoxP3⁺ cells after 5 days of culture. Percentages in the gated populations are indicated. See Figure 1 for other definitions.

was comparable to that of Treg cells from nontransgenic controls ($P > 0.05$) (Figure 3B).

Overexpression of Bcl-2, but not A1, delays the entry into the cell cycle of anti-CD3- and anti-CD28-stimulated T cells in association with the induction of p27 (17,18,23). Since p27 regulates T cell anergy, we explored the role of this cell cycle inhibitor in the increased function of Treg cells from B6-BCL2-TgT mice. Both CD4⁺CD25⁻ cells and Treg cells from B6-BCL2-TgT mice expressed higher levels of p27 than the same populations from B6 nontransgenic and B6-A1-TgT mice (Figure 3C). We then compared the in vitro suppressive capacity of Treg cells from B6 nontransgenic and B6-BCL2-TgT mice deficient or not in p27. A 2–3-fold reduction in the suppressive activity of Treg cells from B6.p27^{-/-} mice was observed compared with Treg cells from B6 nontransgenic mice (Figure 3D). The suppressive capacity of Treg cells from B6-BCL2-TgT mice was markedly reduced in the absence of p27 and was similar to that of Treg cells from nontransgenic mice (Figure 3D). In addition, the same inhibitory pattern was observed when Treg cells from B6-BCL2-TgT or B6 nontransgenic mice were cocultured with CD4⁺ effector cells from B6.p27^{+/+} and B6.p27^{-/-} mice (Figure 3E). Finally, no differences were detected in the anti-CD3-induced prolifera-

tion of CD4⁺ effector cells from B6 nontransgenic and B6.p27^{-/-} mice (Figure 3E).

Enhancement of in vitro Treg cell differentiation in BCL2-TgT mice is dependent on p27. The altered Treg cell distribution observed in BII-immunized F₁-BCL2-TgT mice in comparison to F₁ nontransgenic controls prompted us to compare the in vitro induction of Treg cells between B6 nontransgenic and B6-BCL2-TgT mice. Naive CD4⁺CD25⁻CD62L⁺CD44⁻ cells from both strains of mice were purified and stimulated during 5 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of TGFβ1 and IL-2. The in vitro induction of CD4⁺FoxP3⁺ cells was more prominent in stimulated naive CD4⁺ cells from B6-BCL2-TgT mice than in naive CD4⁺ cells from nontransgenic controls (mean ± SD Treg cell induction after 5 days of culture in nontransgenic mice, 60.9 ± 7.9%; after 5 days of culture in B6-BCL2-TgT mice, 81.2 ± 7.4%) ($n = 6$; $P < 0.001$) (Figure 4A). Such an increase was not observed with naive CD4⁺ cells from B6-A1-TgT mice (Figure 4B). Interestingly, naive CD4⁺ cells from both B6.p27^{-/-} and B6.p27^{-/-}-BCL2-TgT mice exhibited an equally reduced capacity to differentiate into Treg cells in vitro in comparison to naive CD4⁺ cells from nontransgenic controls (Treg cell induction after 5 days of culture in B6.p27^{-/-} mice, 41.3 ± 5.3%; after 5 days of

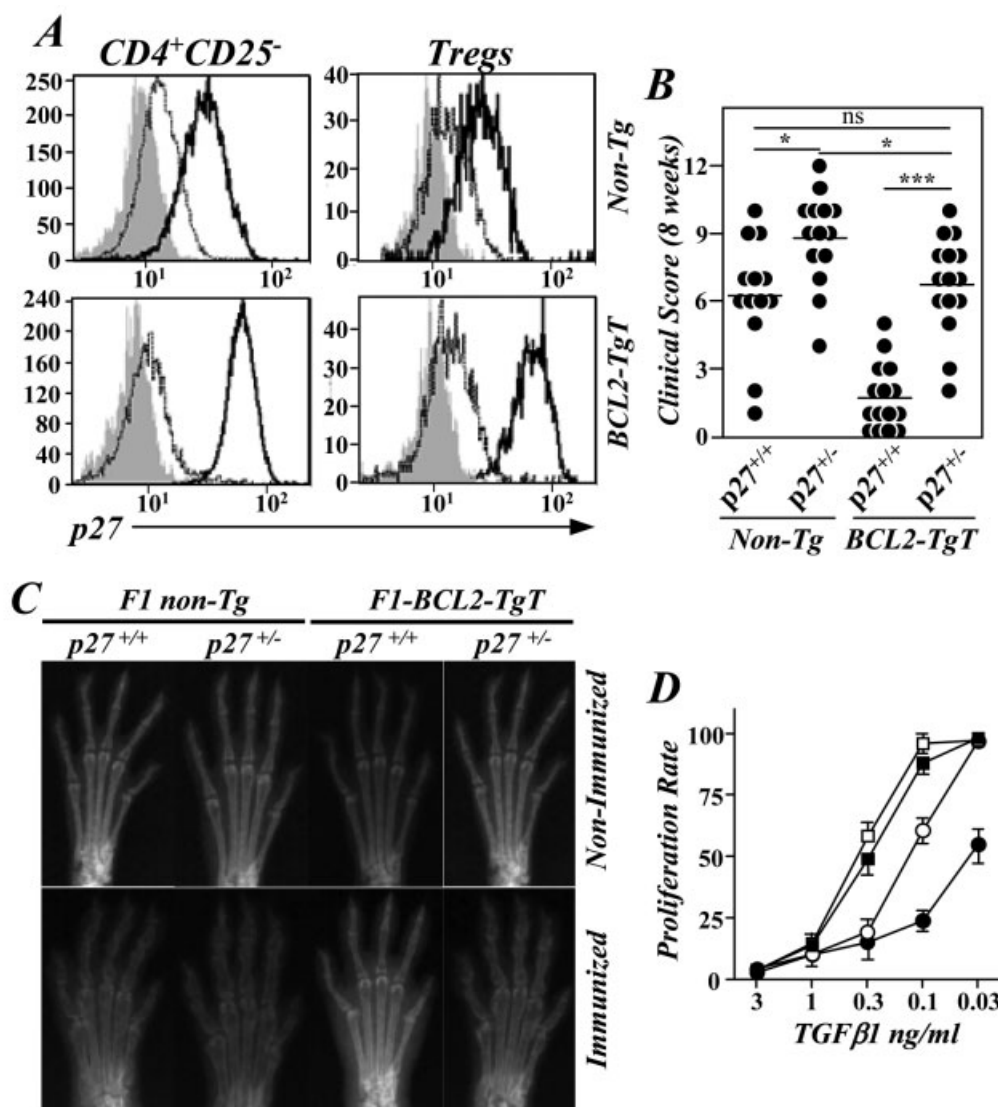


Figure 5. Role of p27^{Kip1} (p27) in protection against CIA in F₁-BCL2-TgT mice and in the regulation of transforming growth factor β (TGF β) signaling in CD4⁺ cells. **A**, Expression of p27 in CD4⁺CD25⁻ T cells and Treg cells in F₁ nontransgenic mice and F₁-BCL2-TgT mice that were p27^{+/+} (solid lines) or p27^{+/-} (dotted lines). The expression of p27 in the same populations of C57BL/6 (B6) p27^{-/-} mice (gray filled histogram) is also shown. **B**, Clinical severity of CIA 8 weeks after immunization with collagen emulsified with CFA. Clinical scores of individual mice from 2 independent experiments are shown. Horizontal lines represent the mean. * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$. **C**, Representative radiographs of the hind paws before and 8 weeks after immunization with collagen emulsified with CFA. **D**, Inhibitory effect of TGF β 1 in the anti-CD3-induced proliferation of CD4⁺ T cells. CD4⁺ cells from B6 nontransgenic mice (open circles), B6-BCL2-TgT mice (solid circles), B6.p27^{-/-} mice (open squares), and B6-BCL2-TgT.p27^{-/-} mice (solid squares) were stimulated with plastic-bound anti-CD3 antibodies in the presence or absence of different concentrations of recombinant murine TGF β 1. Values are the mean $\pm$ SD proliferation rate, calculated as follows: (³H-thymidine incorporation in cells stimulated with anti-CD3 plus TGF β 1/³H-thymidine incorporation in cells stimulated with anti-CD3) $\times$ 100, and are representative of 3 independent experiments. See Figure 1 for other definitions.

culture in B6-BCL2-TgT mice, $38.9 \pm 3.9\%$) ($n = 3$; $P < 0.001$) (Figure 4A).

Down-modulation of p27 expression induces CIA in F₁-BCL2-TgT mice. To directly explore the role of p27 in the protection against CIA observed in F₁-BCL2-

TgT mice, we compared disease development between nontransgenic and TgT mice that were either normal (p27^{+/+}) or heterozygous for a p27-targeted mutation (p27^{+/-}) reducing severely the expression of p27 in both CD4⁺CD25⁻ cells and Treg cells (Figure 5A).

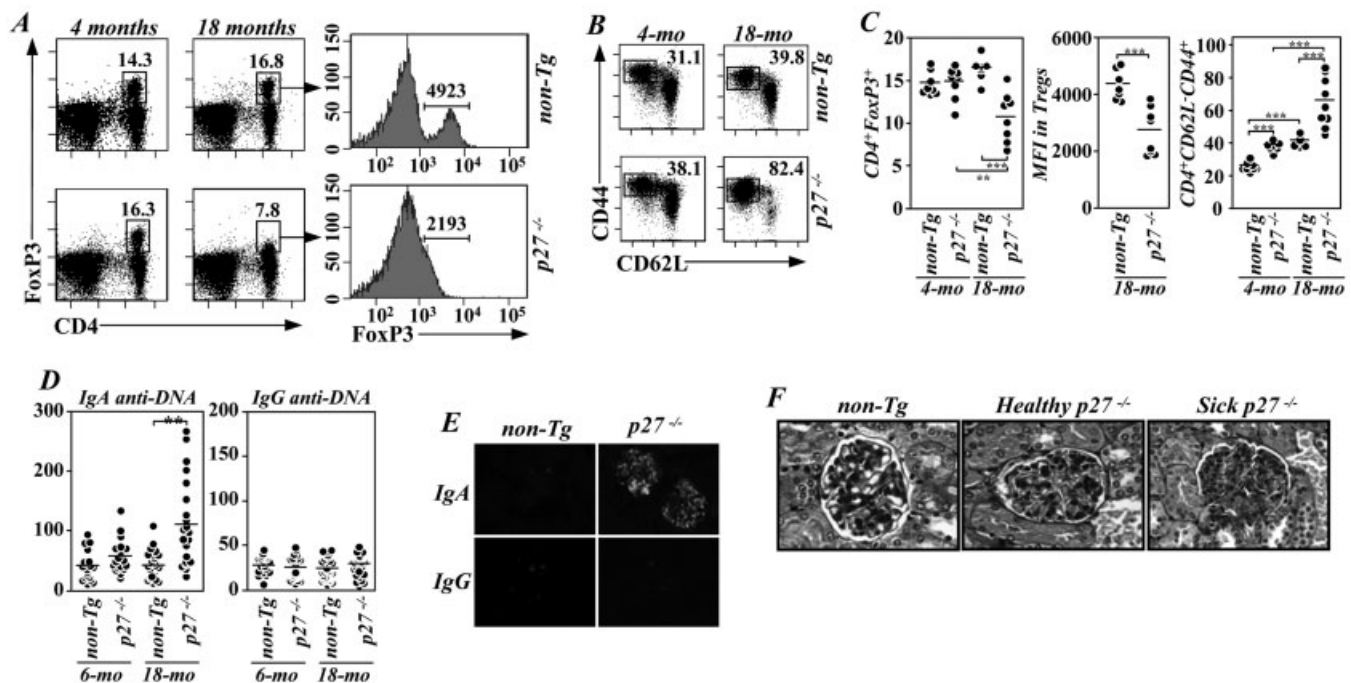


Figure 6. Immunologic defects in B6.p27^{-/-} mice. **A**, Left, Dot plots of spleen CD4⁺FoxP3⁺ cells in 4-month-old and 18-month-old B6 nontransgenic (non-Tg) and B6.p27^{-/-} mice. Percentages in the gated populations are indicated. Right, Histograms of FoxP3 expression in the Treg cell populations (arrows) of 18-month-old B6 nontransgenic and B6.p27^{-/-} mice. The mean fluorescence intensity (MFI) values of the gated populations are indicated. **B**, Dot plots of spleen naive and memory CD4⁺ cells in 4-month-old and 18-month-old B6 nontransgenic and B6.p27^{-/-} mice. Percentages of memory CD4⁺ cells are indicated. **C**, Percentages of CD4⁺FoxP3⁺ cells (left), their MFI values (middle), and memory CD4⁺ cells (right) in the spleens of individual B6 nontransgenic and B6.p27^{-/-} mice. Horizontal lines represent the mean. ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$. **D**, Serum levels of IgA and IgG anti-DNA autoantibodies in individual B6 nontransgenic and B6.p27^{-/-} mice at ages 6 and 18 months. Horizontal lines represent the mean. ** = $P < 0.01$. **E**, Glomerular IgA and IgG deposits in 18-month-old B6 nontransgenic and B6.p27^{-/-} mice. **F**, Histologic appearance of periodic acid-Schiff-stained glomeruli of 18-month-old B6 nontransgenic and B6.p27^{-/-} mice. Original magnification $\times 40$ in **E** and **F**. See Figure 5 for other definitions.

F₁.p27^{+/-} mice developed a more severe CIA than F₁.p27^{+/+} controls (Figures 5B and C). Disease development was inhibited in F₁-BCL2-TgT.p27^{+/+} mice but not in F₁-BCL2-TgT.p27^{+/-} mice, which developed CIA with a severity similar to that in F₁.p27^{+/+} mice but less than that in F₁.p27^{+/-} mice (Figures 5B and C).

It has been demonstrated that p27 can potentiate the transcriptional and antiproliferative activity of Smad3, suggesting that it may act as a positive regulator of TGF β signaling (21,29). We explored such a possibility by comparing the antiproliferative potential of TGF β in anti-CD3-stimulated naive CD4⁺ cells from B6 nontransgenic and B6-BCL2-TgT mice deficient or not deficient in p27. TGF β inhibited the anti-CD3-induced proliferation of naive CD4⁺ cells of B6 nontransgenic mice in a dose-dependent manner (Figure 5D). This antiproliferative capacity was enhanced significantly (3-fold; $P < 0.01$) in CD4⁺ cells from B6-BCL2-TgT mice. In contrast, the absence of p27 in B6.p27^{-/-} and B6.p27^{-/-}-BCL2-TgT mice reduced the antiprolifera-

tive capacity of TGF β in comparison to CD4⁺ cells from B6 nontransgenic mice ($P < 0.03$) (Figure 5D).

Age-dependent expansion of memory CD4⁺ cells and reduction of Treg cells in B6.p27^{-/-} mice in association with the spontaneous development of mild autoimmunity. We finally explored in vivo whether p27 was also a regulator of Treg cells in wild-type B6 mice. At age 4 months, the percentage of Treg cells and their expression level of FoxP3 in the spleen were similar in B6 nontransgenic and B6.p27^{-/-} mice (Figures 6A and C), although the latter already exhibited a small but significant increase in the percentage of memory CD4⁺CD62L⁻CD44⁺ cells in the spleen (Figures 6B and C). However, at age 18 months, a remarkable reduction in the percentage of Treg cells was observed in B6.p27^{-/-} mice in comparison to nontransgenic mice (Figures 6A and C). Notably, these Treg cells from old B6.p27^{-/-} mice expressed much lower levels of FoxP3 than their counterparts from nontransgenic controls (Figures 6A and C). Accompanying the reduction in

Treg cells, old B6.p27^{-/-} mice exhibited a dramatic expansion of memory CD4⁺ cells (Figures 6B and C).

A comparison of serum autoantibodies showed that old, but not young, B6.p27^{-/-} mice displayed increased levels of IgA anti-DNA autoantibodies in comparison to nontransgenic controls, while no significant increases in IgG anti-DNA activities were noted (Figure 6D). In addition, aged B6.p27^{-/-} mice displayed prominent mesangial IgA, but not IgG, deposits in the majority of the glomeruli (Figure 6E). Histologic examination revealed that a fraction of B6.p27^{-/-} mice (4 of 20) exhibited mesangial glomerulonephritis characterized by the expansion of mesangial cell matrix and mesangial cell proliferation in the majority of glomeruli (Figure 6F).

DISCUSSION

Little information is available about the molecular mechanisms that regulate the number and activity of Treg cells in vivo. Using different experimental approaches, other authors showed that Bcl-x_L affected the development and activity of Treg cells (16,30). However, the precise molecular mechanism by which these antiapoptotic factors influenced Treg cells was not elucidated. In our present work, using BCL2-TgT mice and/or p27-deficient mice, we demonstrate that the cell cycle inhibitor p27 plays a crucial role regulating both processes of Treg cell biology.

We have previously reported a Treg cell-dependent protection against 2 different autoimmune diseases, CIA and SLE, in *hBCL2-Ig*-transgenic mice overexpressing Bcl-2 in B cells and minor subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ cells (15). Unlike those transgenic mice (15), the size of the Treg cell population and the distribution among Helios⁺ and Helios⁻ Treg cells in secondary lymphoid organs of nonimmunized BCL2-TgT mice are similar to that of nontransgenic controls. However, a significant increase in the Helios⁻:Helios⁺ Treg cell ratio in the spleen, compatible either with changes in the activation status of Treg cells or with an expansion of iTreg cells (31,32), is observed in these transgenic mice after immunization with BII. These results suggest that the overexpression of human Bcl-2 in naive CD4⁺ cells disturbs the mechanisms that regulate antigen-driven homeostasis of these cells during an immune response. This idea is supported by the increased in vitro Treg cell differentiation observed in BCL2-TgT-naive CD4⁺ cells stimulated under Treg cell differentiation conditions.

Together with the enhanced in vitro differentiation and consistent with the protection against CIA,

Treg cells from BCL2-TgT mice showed an improved suppressive activity. Both phenomena were likely responsible for the deficient induction of Th17 cells after BII immunization in the spleens of F₁-BCL2-TgT mice. In fact, percentages of Th17 cells increased in these BII-immunized transgenic mice after Treg cell depletion. Since the best-known function of Bcl-2 was to inhibit apoptosis, we speculated that the enhancement of Treg cell activity in BCL2-TgT mice was secondary to their prolonged survival that allowed them to exert their suppressive activity during longer periods of time. The increase in the survival of naive CD4⁺ cells and Treg cells in the periphery, secondary to Bcl-2 overexpression, might also potentiate their differentiation into Treg cells during an immune response or their accumulation once the immune response was finished.

It was reported that the positive effect of TGFβ in the generation of Treg cells in the thymus and in their maintenance in the periphery was regulated by the antagonistic activity of antiapoptotic and proapoptotic Bcl-2 family members (14). In addition, it was described that the survival advantage conferred to CD4⁺ cells after transduction with a Bcl-x_L-containing retrovirus potentiated the capacity of FoxP3-transduced CD4⁺ cells to differentiate into Treg cells (30). However, we demonstrated in the present study that the increase in T cell survival by itself was not responsible for these phenomena, since the T cell overexpression of the antiapoptotic Bcl-2 family member A1 failed to enhance the suppressive activity of Treg cells and their generation in vitro from naive CD4⁺ cells.

Bcl-2, but not A1, also negatively influenced the entry into the cell cycle of different cell types including lymphocytes (17,18,23). This antiproliferative activity of Bcl-2 in T cells might be associated, at least in part, with its capacity to induce the expression of p27 (17–19). Because of the association between p27 activity and the induction of T cell anergy (20,21), we addressed the role of this cell cycle inhibitor in the enhancement of Treg cell activity and differentiation observed in BCL2-TgT mice as well as in their protection against CIA. Several forms of evidence pointed to p27 as the molecule through which the overexpression of Bcl-2 exerted these activities. First, the expression of p27 was induced in T cells from BCL2-TgT mice. Second, the enhanced in vitro activity of Treg cells as well as the increased differentiation of naive CD4⁺ cells into Treg cells observed in BCL2-TgT mice were lost in mice deficient in p27. Third, down-modulation of p27 expression in F₁-BCL2-TgT.p27^{+/-} and F₁.p27^{+/-} mice promoted or aggravated the development of CIA, respectively. Finally, our study showed that p27 also altered Treg cell

biology in B6 mice. Thus, B6.p27^{-/-} mice exhibited a reduction in the number of peripheral Treg cells, in the expression of FoxP3 in these cells, and in their differentiation and suppressive activity *in vitro* in comparison to nontransgenic mice.

The deficient Treg cell activity in B6.p27^{-/-} mice was accompanied by an activation of the immune system, manifested by a marked expansion of memory CD4⁺ cells and by the production of IgA autoantibodies and their glomerular deposition. These abnormalities were age dependent, becoming visible mostly in very old mice, which could explain why they had not been described previously (33,34). However, the autoimmunity observed in B6.p27^{-/-} mice had a low pathologic significance, as only a limited number of these animals developed a severe glomerulonephritis and the mortality rate was essentially similar to that of nontransgenic controls (Iglesias M, Merino R: unpublished observations). The non-proautoimmune B6 genetic background of these deficient mice, the presence of a residual Treg cell activity, and the fact that the circulating autoantibodies and glomerular deposits were IgA instead of IgG might explain their low incidence of severe lupus-like glomerular lesions. Notably, it was demonstrated that the development of lupus nephritis was largely mediated by the IgG class of autoantibodies, as efficient activation of the stimulatory IgG Fc receptors and complement by IgG immune complexes appeared critical for the triggering of glomerular inflammation (35,36), while mouse IgA was unable to activate complement or immune effector cells through stimulatory Fc receptors (37).

We show in the present study that in addition to p27 and Treg cells, Bcl-2 overexpression influences T cell activity by other mechanisms. Thus, the *in vitro* suppressive activity of Treg cells in B6-BCL2-TgT.p27^{-/-} mice is higher than that observed with Treg cells from B6.p27^{-/-} mice, and the increase in Th17 cells after BII immunization in Treg cell-depleted F₁-BCL2-TgT mice is significantly lower than that in Treg cell-depleted nontransgenic controls. Studies in Bim-deficient mice show that an increase in the antiapoptotic:proapoptotic ratio of Bcl-2 family members suppresses autoimmune responses modulating the NF-AT-dependent T cell activation (38). However, this alternative mechanism seems to play a minor role in the protection against autoimmunity in our BCL2-TgT mice, and although both Treg cell-depleted F₁-BCL2-TgT mice and F₁-BCL2-TgT.p27^{+/-} mice develop a milder CIA in comparison to their respective controls, disease severity in these animals is still high and similar to that in untreated nontransgenic p27^{+/+} mice.

Changes in p27 expression can also influence the

activity of autoreactive effector T cells promoting autoimmune responses in p27^{+/-} and p27^{-/-} mice. Although we have not addressed this possibility in mice with a selective down-regulation of p27 expression in different T cell populations, our results clearly show that this hypothetical T cell hyperactivity in p27^{+/-} mice is not associated with their reduced *in vitro* sensitivity to Treg cell-mediated suppression or their anti-CD3-induced proliferative capacity. In addition, it is important to stress that the severity of CIA in Treg cell-depleted F₁ nontransgenic mice is essentially identical to that in F₁.p27^{+/-} mice, indicating that a deficient Treg cell functionality by itself may explain the exacerbation of the autoimmune disease observed in these animals.

Our present results are indicative of a role of p27 as a positive regulator of TGFβ signaling in CD4⁺ cells enhancing the differentiation and activity of Treg cells. We show in the present study that the expression of p27 determines the capacity of TGFβ to suppress the proliferation of naive CD4⁺ cells. These results are consistent with the observation that in anergic CD4⁺ cells, p27 blocks the cyclin-dependent kinase 2-dependent phosphorylation of Smad3 at Ser²¹² (21). Such phosphorylation inhibits the transcriptional and antiproliferative activity of Smad3 (29). Alternatively, p27 may also influence Treg cell activity and differentiation by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity, which negatively regulates Treg cells (39), by a mechanism that may involve Rho proteins (40,41). Experiments are in progress to fully address these important questions. In conclusion, our study identifies p27 as a new molecular regulator of Treg cell biology that can be used for the design of new therapeutic strategies in autoimmune or inflammatory diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. B. Prystowsky (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) for the generous gift of A1-TgT mice, Drs. Shimon Sakaguchi (Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan), S. Izui (University of Geneva, Geneva, Switzerland), and M. Lopez-Hoyos (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain) for discussions, Dr. Ethan M. Shevach (National Institutes of Health, Bethesda, MD) for his advice with cell cultures, E. del Cerro for cell sorting, and M. Aramburu, N. Cobo, and I. Gómez for technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Ramón Merino had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Iglesias, J. Merino, R. Merino.

Acquisition of data. Iglesias, Postigo, Santiuste, González, Buelta, Tamayo.

Analysis and interpretation of data. Iglesias, J. Merino, R. Merino.

REFERENCES

1. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151–64.
2. Chatila TA, Blaese F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000;106:R75–81.
3. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20–1.
4. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–6.
5. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
6. Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337–42.
7. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002;168:1080–6.
8. Zhou G, Levitsky HI. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol* 2007;178:2155–62.
9. Curiel TJ. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 2008;20:241–6.
10. Wohlfert E, Belkaid Y. Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections. *J Clin Immunol* 2008;28:707–15.
11. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25[−] naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875–86.
12. Li MO, Flavell RA. TGF- β : a master of all T cell trades. *Cell* 2008;134:392–404.
13. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2008;9:632–40.
14. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor- β signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 2010;32:642–53.
15. Gonzalez J, Tamayo E, Santiuste I, Marquina R, Buelta L, Gonzalez-Gay MA, et al. CD4⁺CD25⁺ T cell-dependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes. *J Immunol* 2007;178:2778–86.
16. Sharabi A, Lapter S, Mozes E. Bcl-xL is required for the development of functional regulatory CD4 cells in lupus-afflicted mice following treatment with a tolerogenic peptide. *J Autoimmun* 2010;34:87–95.
17. Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ. Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9545–52.
18. Vairo G, Soos TJ, Upton TM, Zalvide J, DeCaprio JA, Ewen ME, et al. Bcl-2 retards cell cycle entry through p27^{Kip1}, pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol* 2000;20:4745–53.
19. Brady HJ, Gil-Gomez G, Kirberg J, Berns AJ. Bax α perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J* 1996;15:6991–7001.
20. Boussiotis VA, Freeman GJ, Taylor PA, Berezovskaya A, Grass I, Blazar BR, et al. p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nat Med* 2000;6:290–7.
21. Li L, Iwamoto Y, Berezovskaya A, Boussiotis VA. A pathway regulated by cell cycle inhibitor p27^{Kip1} and checkpoint inhibitor Smad3 is involved in the induction of T cell tolerance. *Nat Immunol* 2006;7:1157–65.
22. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991;67:879–88.
23. Gonzalez J, Orlofsky A, Prystowsky MB. A1 is a growth-permissive antiapoptotic factor mediating postactivation survival in T cells. *Blood* 2003;101:2679–85.
24. Postigo J, Genre F, Iglesias M, Fernandez-Rey M, Buelta L, Rodriguez-Rey JC, et al. Exacerbation of type II collagen-induced arthritis in apolipoprotein E-deficient mice in association with the expansion of Th1 and Th17 cells. *Arthritis Rheum* 2011;63:971–80.
25. Santiuste I, Buelta L, Iglesias M, Genre F, Mazorra F, Izui S, et al. B-cell overexpression of Bcl-2 cooperates with p21 deficiency for the induction of autoimmunity and lymphomas. *J Autoimmun* 2010;35:316–24.
26. Griffiths MM, Cremer MA, Harper DS, McCall S, Cannon GW. Immunogenetics of collagen-induced arthritis in rats: both MHC and non-MHC gene products determine the epitope specificity of immune response to bovine and chick type II collagens. *J Immunol* 1992;149:309–16.
27. Marquina R, Diez MA, Lopez-Hoyos M, Buelta L, Kuroki A, Kikuchi S, et al. Inhibition of B cell death causes the development of an IgA nephropathy in (New Zealand White x C57BL/6)F¹-bcl-2 transgenic mice. *J Immunol* 2004;172:7177–85.
28. Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ* 2012;19:67–74.
29. Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature* 2004;430:226–31.
30. Haque R, Lei F, Xiong X, Wu Y, Song J. FoxP3 and Bcl-xL cooperatively promote regulatory T cell persistence and prevention of arthritis development. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R66.
31. Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2012;188:976–80.
32. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2010;184:3433–41.
33. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell* 1996;85:733–44.
34. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, et al. Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 1996;85:707–20.
35. Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodera A, Matis LA. Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:8563–68.
36. Clynes R, Dumitru C, Ravetch JV. Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* 1998;279:1052–4.

37. Baudino L, Fossati-Jimack L, Chevalley C, Martinez-Soria E, Shulman MJ, Izui S. IgM and IgA anti-erythrocyte autoantibodies induce anemia in a mouse model through multivalency-dependent hemagglutination but not through complement activation. *Blood* 2007;109:5355–62.
38. Ludwinski MW, Sun J, Hilliard B, Gong S, Xue F, Carmody RJ, et al. Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1706–13.
39. Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT–mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells. *J Exp Med* 2008;205:565–74.
40. Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM. p27^{Kip1} modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* 2004;18:862–76.
41. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 2000;275:36803–10.

GITR contributes to the systemic adjuvanticity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin

Esther Tamayo¹, Jorge Postigo¹, Jovanna González¹,
Maigualida Fernández-Rey¹, Marcos Iglesias^{1,2}, Inés Santiuste^{1,2},
Carlo Riccardi³, Rino Rappuoli⁴, Giuseppe Del Giudice⁴,
Ramón Merino^{*1,2} and Jesús Merino^{*1}

¹ Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

² Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Cantabria-IDICAN, Santander, Spain

³ Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Farmacologia, Tossicologia e Chemioterapia, Università di Perugia, Perugia, Italy

⁴ Novartis Vaccines and Diagnostics, Siena, Italy

The *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT) possesses a powerful mucosal and systemic adjuvant effect. However, little is known about the cellular and molecular basis of the immunostimulatory activity of LT at the mucosal level, and even less information is available on the mechanisms underlying its systemic adjuvant activity. In this study, we show that distinct mechanisms are responsible for the parenteral and mucosal adjuvanticity of LT. Indeed, the systemic administration of LT upregulates the expression of glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR), but not other activation markers, in naive T cells. Using WT and GITR-deficient mice and LT and its enzymatically inactive mutant LTK63 as adjuvants, we show that the induction of GITR expression in T cells accounts for the systemic immunostimulatory capacity of LT, which requires an intact enzymatic activity. In contrast, the mucosal administration of LT does not induce GITR expression on Peyer's patch T cells and accordingly no differences are observed in the mucosal adjuvanticity of LT between WT and GITR-deficient mice. Altogether, our results demonstrate the distinct effect of LT after parenteral administration when compared with the mucosal delivery, and describe a new mechanism of LT adjuvanticity related to its ability to induce the expression of GITR in CD4⁺ T cells.

Key words: Costimulation · T cells · Vaccination

Introduction

The *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT) and *Vibrio cholerae* toxin (CT) are two bacterial toxins with a powerful adjuvant capacity [1]. Both toxins consist of a monomeric A subunit with enzymatic activity and of a homo-pentameric ring of B subunits

that bind to the cell surface ganglioside GM1. The enzymatic activity of these toxins results in a persistent activation of adenylate cyclase and the increase of cytosolic cAMP [2], which disrupts cell homeostasis with a variety of toxic effects [2, 3]. The high toxicity of LT and CT has stimulated the search for mutants with low or no toxicity retaining their immunostimulatory capacity. The LTK63 (Ser to Lys substitution at position 63 of the A subunit of LT) and LTR72 (Ala to Arg

Correspondence: Dr. Ramón Merino
e-mail: merinor@unican.es

*The last two authors share senior authorship.

substitution at position 72 of the A subunit of LT) toxoids are two LT mutants with none or a reduced enzymatic activity and toxicity, respectively [4, 5]. However, the attenuation of the enzymatic activity of these mutants is associated with some decrease in their adjuvanticity [4, 5]. Thus, it becomes important to understand the mechanisms that link enzymatic activity and adjuvanticity of LT. Most of the present knowledge of the adjuvant effects of these molecules is based on experiments with animals immunized mucosally, mainly i.n. [6]. However, some reports from animal [7] and human studies [8, 9] have raised concerns on the safety of these molecules after i.n. administration. LT and LT mutants are also strong adjuvants following parenteral administration [10, 11]. However, if little is still known on the fine molecular mechanisms underlying the mucosal adjuvanticity of LT and LT mutants, even less information is available on the effects triggered by these molecules after systemic administration.

Several studies point to DC as the principal cellular target of LT and CT adjuvanticity *in vivo* [12, 13]. Both toxins induce the maturation of DC, increasing their antigen presentation capability, their migration to the lymph nodes and their interaction with naive T cells [14]. In addition, CT and LT may act directly on lymphocytes inducing their activation and/or cell death [3, 15, 16]. We have previously shown that administration of LT promotes an intense but incomplete apoptosis of lymphocytes [5, 16]. This, together with the capacity of the toxin to stimulate the remaining lymphocytes [15], may explain the apparent paradox that an agent with such a potent pro-apoptotic activity can be an adjuvant. An interesting observation is that the LT-mediated cell death is only observed after its systemic administration [3], suggesting that the immunomodulatory properties of LT are highly influenced by the route of toxin delivery. Because of the glucocorticoid-mediated effect of LT on apoptosis [3, 16], our interest was focused on the glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR), a member of the TNFR superfamily that is constitutively expressed at high levels in Treg and at low levels on conventional CD4⁺CD25[−] and CD8⁺ T cells where it is rapidly upregulated after activation [17]. As GITR-GITRL signaling pathways can influence the activation and activity of effector and regulatory T cells as well as DC [17–19], we have analyzed the possible role of GITR in the systemic or mucosal adjuvanticity of LT in comparison with the enzymatically inactive LTK63 mutant. We report here that the systemic adjuvanticity of LT associated with the enzymatic activity is linked to their capacity to induce the expression of GITR in T cells. We further demonstrate that the mechanisms of adjuvanticity of these immunostimulatory molecules can be distinct at different anatomical sites.

Results

Systemic, but not mucosal, administration of LT induces the expression of GITR in naive T cells

The expression of a panel of markers associated with lymphocyte activation was explored in mature T and B lymphocytes 72 h after

systemic LT administration. Injection of 1 µg of LT into the footpad (f.p.) of BALB/c mice caused a marked reduction in the number of total CD4⁺ cells in the spleen and of CD4⁺ T cells that were either CD25⁺, CD69⁺, CTLA-4⁺, CD45RB^{−/low} or CD62L[−] (Fig. 1A). Remarkably, the number of CD4⁺ T cells expressing high levels of GITR remained unchanged after LT administration (Fig. 1A).

As LT promotes an intense T-cell apoptosis [3, 16], we explored whether the maintenance in the number of CD4⁺ GITR^{high} cells after LT treatment could reflect an enhanced resistance of these cells to LT-induced apoptosis and/or an expansion of this cell population. For that we explored first the effects of LT in BALB/c mice after bilateral adrenalectomy, which severely impairs LT-induced lymphocyte apoptosis [3, 16]. In these adrenalectomized mice, f.p. treatment with LT did not modify significantly the numbers of CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD4⁺CD45RB^{−/low} or CD4⁺CD62L[−] cells and slightly reduced the number of CD4⁺CD25⁺ cells (Fig. 1A). In contrast, the number of CD4⁺CD25[−] GITR^{high} cells was increased in these mice (Fig. 1A). In addition, no differences in the susceptibility of peripheral CD4⁺ T cells to f.p. LT-induced apoptosis were found between Sv129-GITR^{−/−} mice and WT littermates (number of spleen CD4⁺ T cells (× 10⁶) i.n.; Sv129 WT mice receiving PBS: 16.7 ± 1.3, or 1 µg of LT: 5.7 ± 0.4 (n = 4); in Sv129-GITR^{−/−} (GITR-deficient) mice receiving PBS: 13.6 ± 4.6, or 1 µg of LT: 4.3 ± 0.8 (n = 3)). Induction of GITR expression was observed in CD4⁺CD25[−]Foxp3[−] T cells but not in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg (Fig. 1B). The expansion of CD4⁺CD25[−] GITR^{high} cells in adrenalectomized mice was evident as early as 24 h after LT administration, returning to basal levels 10 days later (Fig. 1C) and was dose dependent (Fig. 1D). A similar increase in CD4⁺CD25[−] GITR^{high} cells was observed 72 h after f.p. administration of LT in C57BL/6 (B6) Tg mice overexpressing in T cells both a dominant-negative form of FADD (FADD-DN) and human Bcl-2 (hBcl-2) (Fig. 1E) and which are refractory to the LT-induced apoptosis of mature T cells [16]. LT also promoted the expression of GITR in inguinal and mesenteric lymph node cells and purified CD4⁺CD25[−] spleen T cells stimulated *in vitro* with LT during 24 h (Table 1). Finally, f.p. injection of LT into bilateral adrenalectomized BALB/c mice increased the number of CD8⁺ GITR^{high} cells but not of B220⁺ GITR^{high} cells (Fig. 1F).

To investigate whether the expansion of CD4⁺CD25[−] GITR^{high} cells in the LT-treated mice was due to the induction of GITR expression in naive CD4⁺ T cells or to the proliferation of pre-existing CD4⁺CD25[−] GITR^{high} cells, bilateral adrenalectomized BALB/c mice were treated with BrdU prior and after the f.p. injection of LT. Seventy-two hours after toxin administration, the percentage of spleen CD4⁺BrdU⁺ cells was similar to that found in untreated mice (Fig. 2). In addition, LT did not promote an increase in CD8⁺BrdU⁺ and B220⁺BrdU⁺ cells in these mice (Fig. 2).

We further investigated the capacity of LT to induce GITR expression in lymphocytes after mucosal administration. Intragastric (i.g.) administration of 10 or 50 µg of LT into BALB/c mice failed to promote GITR expression 48 h later in

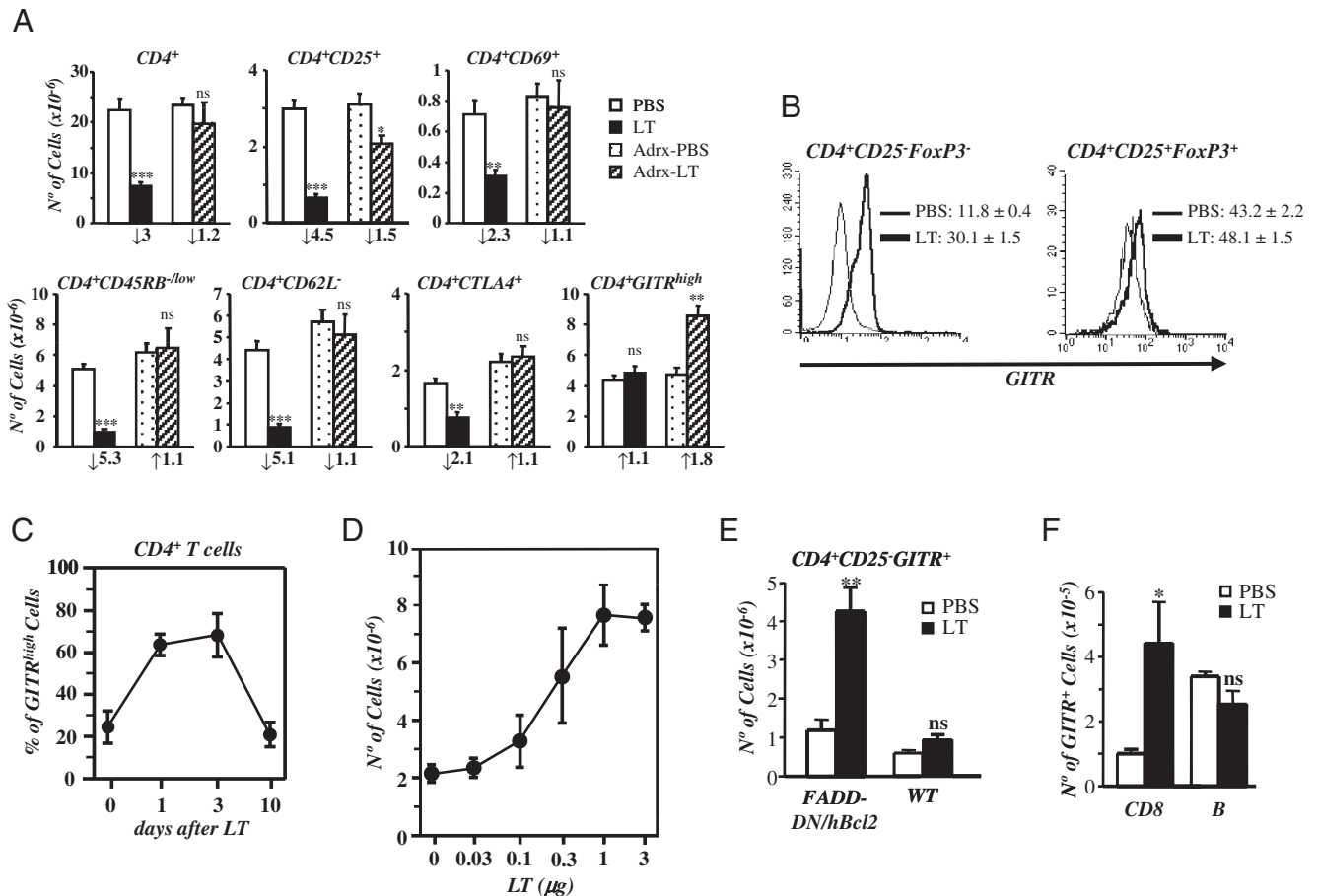


Figure 1. Transient T-cell induction of GITR expression after systemic injection of LT. (A) Expression of activation markers in CD4⁺ T cells in the spleen 3 days after f.p. injection of 1 μg of LT or PBS into normal or bilateral adrenalectomized (Adrx) BALB/c mice. The reduction (↓) and increase (↑) indexes after LT treatment are indicated. (B) Induction of GITR expression on CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ but not on CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells from bilateral adrenalectomized BALB/c mice. (C) Kinetics of GITR induction in CD4⁺ T cells in the spleen of bilateral adrenalectomized BALB/c mice after f.p. injection of LT. (D) Dose-dependent induction of GITR expression on CD4⁺ T cells in the spleen of bilateral adrenalectomized BALB/c mice 72 h after f.p. injection of LT. (E) Number of CD4⁺GITR^{high} T cells in the spleen of B6.Lck.hbcl-2/FADD-DN double-Tg mice 3 days after the f.p. injection of PBS or 1 μg of LT. (F) Number of CD8⁺GITR^{high} T and B220⁺GITR^{high} cells in the spleen of bilateral adrenalectomized BALB/c mice treated with PBS or with 1 μg of LT into the f.p. The results, representative of at least two independent experiments ($n = 5$ mice per group), are expressed as the mean ± SEM of the number of viable cells (A, C–F) or MFI of GITR expression (B) of the indicated populations. Statistical differences between PBS- and LT-treated animals, evaluated by the Student's *t*-test, are indicated as follows: ns, non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 1. In vitro induction of GITR expression on CD4⁺ T cells by LT^{a)}

	% of CD4 ⁺ GITR ⁺		MFI of GITR	
	Medium	LT	Medium	LT
Purified CD4 ⁺ CD25 ⁻ cells	18.1 ± 0.9	82.8 ± 6.1	11.2 ± 0.6	33.8 ± 1.8
Inguinal lymph node cells	16.6 ± 2.4	75.2 ± 3.5	14.9 ± 0.4	31.8 ± 2.4
Mesenteric lymph node cells	18.3 ± 1.2	76.8 ± 4.8	10.8 ± 0.3	37.9 ± 0.6
Peyer's patch cells	17.7 ± 2.4	73.2 ± 1.7	14.1 ± 1.1	33.5 ± 2.1

^{a)} The indicated cells (5×10^5 cells/well) from 2-month-old BALB/c were either non-stimulated (medium) or stimulated in vitro with LT (0.5 μg/mL) during 24 h. Results are expressed as the mean ± SD of the percentage of GITR^{high} cells and the MFI of GITR expression in viable CD4⁺CD25⁻ cells in triplicate cultures, evaluated by flow cytometry.

CD4⁺CD25⁻ T cells from both the Peyer's patches (% of CD4⁺ GITR⁺ T cells in, untreated: 19.7 ± 2.1%; treated with 10 μg of LT: 18.6 ± 1.3%; treated with 50 μg of LT: 25.1 ± 4.1%; $n = 5$; $p > 0.08$ in all cases) and the draining mesenteric lymph

nodes (% of CD4⁺GITR⁺ T cells in, untreated: 18.9 ± 4.6%; treated with 10 μg of LT: 16.1 ± 1.9%; treated with 50 μg of LT: 21.7 ± 4.5%; $n = 5$; $p > 0.08$ in all cases), even after treatment with neomycin before (48 h) and after toxin

administration (data not shown). Similarly, LT (10 µg) did not induce GITR in CD4⁺CD25[−] T cells from the draining mediastinal lymph nodes when administered i.n. (data not shown). In contrast, *in vitro* stimulation of Peyer's patch cells with LT during 24 h strongly induced the expression of GITR on CD4⁺CD25[−] T cells at levels comparable with those observed in *in vitro* LT-stimulated CD4⁺CD25[−] T cells from mesenteric lymph nodes (Table 1).

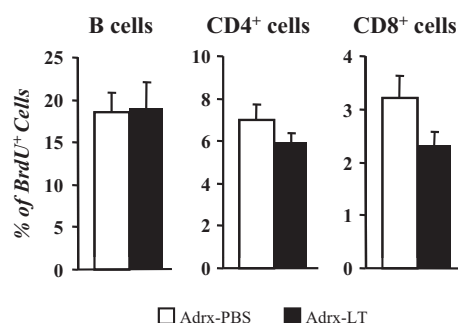


Figure 2. LT fails to induce the proliferation of mature B and T cells. Percentages of BrdU⁺-B220⁺, BrdU⁺-CD4⁺ or BrdU⁺-CD8⁺ splenocytes in bilateral adrenalectomized BALB/c mice 3 days after f.p. administration of LT expressed as the mean ± SEM. Results are representative of three independent experiments (*n* = 5 mice per group). No statistical differences, evaluated by the Student's *t*-test, were observed between PBS- and LT-treated animals.

T-cell induction of GITR by LT requires its enzymatic activity and is specific of this adjuvant

To explore whether the enzymatic activity of LT was required to induce the expression of GITR in CD4⁺ T cells, bilateral adrenalectomized BALB/c mice were injected into the f.p. with 1 or 30 µg of either the enzymatically inactive or the partially active LTK63 and LTR72 mutants [4, 5]. At the higher dose, but not with the lower dose, of the toxins, the partially active LTR72 mutant, but not the fully detoxified LTK63 mutant, was able to induce GITR expression in naive CD4⁺CD25[−] T cells (Fig. 3 and data not shown).

We then investigated the capacity of different adjuvants/immunostimulators such as CFA, aluminum hydroxide and MF59 or LPS, to regulate GITR expression in CD4⁺ T cells from BALB/c mice. None of these adjuvants/immunostimulators administered i.p. modified significantly the numbers of CD4⁺CD25[−] GITR^{high} cells in the spleen of these mice (Fig. 3).

Systemic administration of LT blocks the induction of tolerance by a GITR-dependent mechanism

Pre-treatment of adult mice with monomeric deaggregated human gammaglobulin (DHGG) induces immunological tolerance against the immunogenic and aggregated HGG (AHGG) in

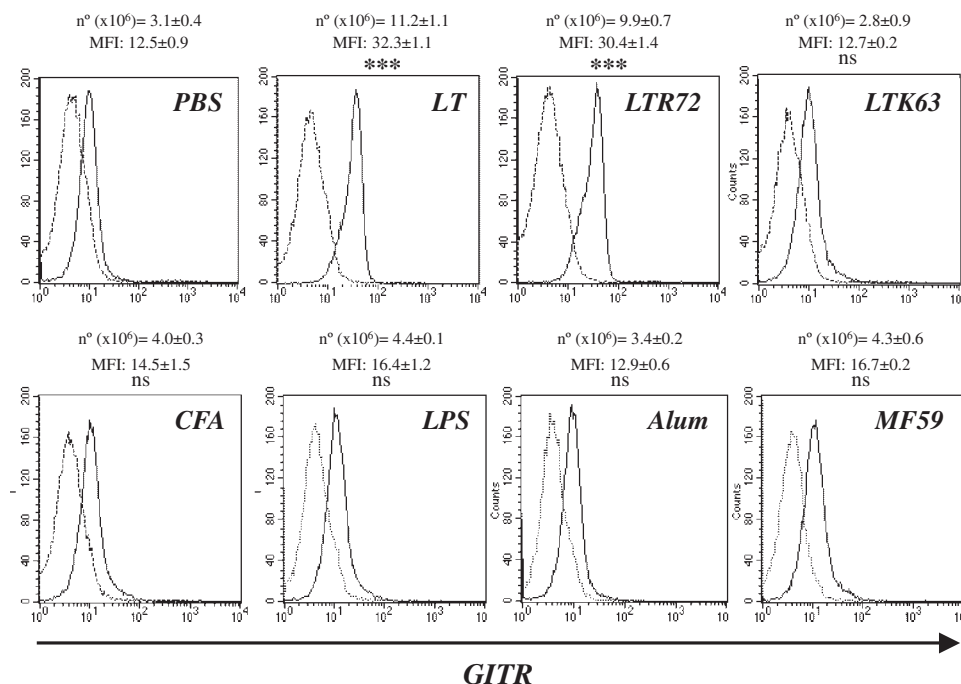


Figure 3. The LT induction of GITR in T cells requires its enzymatic activity and is specific of this adjuvant. BALB/c mice (3–5 mice/group) were injected into the f.p. with 1 µg of LT, 30 µg of LTR72 or LTK63 or i.p. with 200 µL of CFA (50% v/v), 50 µg of LPS, 1 mg of aluminum hydroxide or 200 µL of MF59 (50% v/v). Representative panels of two independent experiments show the expression of GITR in CD4⁺CD25[−] splenocytes (solid line) measured by flow cytometry 72 h later. Dotted lines represent background fluorescence. The mean ± SEM of the number of CD4⁺GITR^{high} cells (top) and the MFI of GITR expression (bottom) are indicated. Statistical differences between PBS- and adjuvant-treated animals, evaluated by the Student's *t*-test, are indicated as follows: ns, non-significant, ****p* < 0.001.

murine mature lymphocytes [20]. Using this experimental model, we first compared the capacity of LT and LTK63 to interfere with the induction of immunological tolerance. BALB/c mice injected i.p. on day 0 with 3 mg of DHGG and boosted 10 days later with 400 µg of AHGG, failed to produce IgG anti-HGG Ab 7 days after AHGG immunization (Fig. 4A). As previously reported [20], mice receiving LPS at the time of DHGG treatment produced high levels of IgG anti-HGG Ab (Fig. 4A). A similar rupture of tolerance was observed when DHGG-injected BALB/c mice received 1 µg of LT into the f.p., but not 5 µg of LTK63

(Fig. 4A). In contrast, the f.p. treatment with 0.1 µg of LT failed to block the induction of tolerance to HGG (data not shown), in agreement with the absence of induction of GITR expression in T cells (Fig. 1D). The induction of tolerance in this model was not due to the activity of Treg. Thus, DHGG-tolerized BALB/c mice depleted in Treg after treatment with an anti-CD25 mAb did not produce significant levels of IgG anti-HGG Ab after AHGG immunization, in contrast with non-tolerized but AHGG-immunized BALB/c mice depleted in Treg (Fig. 4A).

We then explored the role of the induction of GITR in CD4⁺ T cells in the mechanism of systemic adjuvanticity of LT. The engagement of GITR with the agonistic anti-GITR mAb DTA-1 [18] at the time of DHGG injection blocked the induction of tolerance to HGG, and these mice exhibited increased serum levels of IgG anti-HGG Ab (Fig. 4A). Interestingly, f.p. administration of LT into Sv129-GITR^{-/-} mice failed to block the induction of tolerance to HGG, as efficiently as observed in WT controls; these mice had reduced levels of IgG anti-HGG Ab that were at titers close, although slightly higher, to those found in DHGG-AHGG-tolerized controls (Fig. 4B).

LT and LTK63 exhibit similar systemic but not mucosal adjuvanticity in GITR^{-/-} mice

In view of the potential importance of GITR induction in CD4⁺ T cells in the systemic adjuvanticity of LT associated with its enzymatic activity, we have explored whether in an immunization protocol where LT and LTK63 trigger an immune response to a co-administered antigen, the systemic adjuvanticity of both toxins will be similar in GITR^{-/-} mice. Sv129-GITR^{-/-} and WT mice were primed and boosted 20 days later i.p. with OVA using LT, LTK63 or CFA/IFA as adjuvants. According to the previous studies [4, 5], 15 days after the second immunization the levels of IgG anti-OVA Ab were higher in WT mice immunized with OVA-LT than in WT mice immunized with OVA-LTK63 (Fig. 5A). However, an important reduction in the levels of IgG anti-OVA Ab was observed in Sv129-GITR^{-/-} mice immunized i.p. with OVA-LT that were similar to those found in both groups of mice immunized i.p. with OVA-LTK63 (Fig. 5A). As a control, no differences in the levels of IgG anti-OVA Ab were observed between WT and Sv129-GITR^{-/-} mice when CFA/IFA was used as the adjuvant (Fig. 5A). The decreased IgG anti-OVA Ab production observed in LT-OVA-immunized Sv129-GITR^{-/-} mice was associated with a selective reduction in the levels of IgG2a anti-OVA Ab ($p < 0.01$), being the titers of IgG1 and IgG2b anti-OVA Ab similar between both groups of animals ($p > 0.05$ in both the cases; Fig. 5B). Finally, similar levels of circulating IgA anti-OVA Ab were measured in both groups of mice (data not shown).

To explore the mechanisms accounting for the selective reduction of IgG2a anti-OVA Ab in LT-treated Sv129-GITR^{-/-} mice, the expression of IFN-γ and IL-4 in the spleen was compared between bilateral adrenalectomized Sv129-GITR^{-/-} and WT mice treated i.p. with 1 µg of LT by real-time quantitative RT-PCR. An increase in IFN-γ and IL-4 mRNA transcripts was

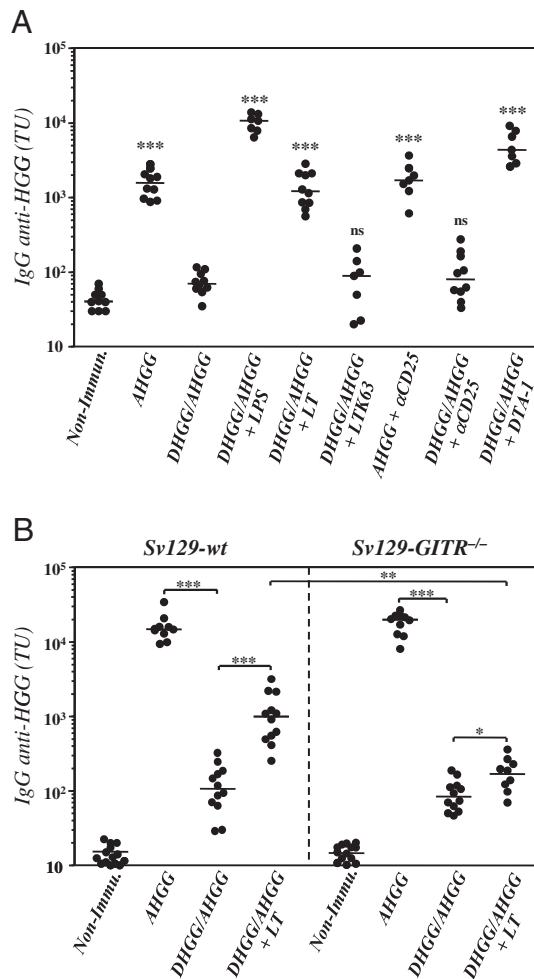


Figure 4. LT but not LTK63 blocks the induction of tolerance to HGG by a GITR-dependent mechanism. (A) Two-month-old BALB/c mice were tolerized with DHGG and immunized i.p. with AHGG 10 days later. Non-immunized mice or animals injected i.p. with AHGG were used as controls. Tolerized mice were either untreated or treated with LPS, LT or LTK63 i.p. at the time of DHGG injection or treated with either a cytotoxic anti-CD25 mAb or an agonistic anti-GITR mAb (DTA-1). (B) Two-month-old Sv129-GITR^{-/-} mice or WT littermates were tolerized with DHGG and treated or not with 1 µg of LT 10 days before the immunization with AHGG-CFA. The presence of circulating IgG anti-HGG Ab was evaluated 7 days later by ELISA. Values of individual mice are expressed in TU. Bars represent the mean value of each examination. Statistical differences between PBS- and LT-treated animals, evaluated by the Mann–Whitney test, are indicated as follows: ns, non-significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Results are representative of three independent experiments.

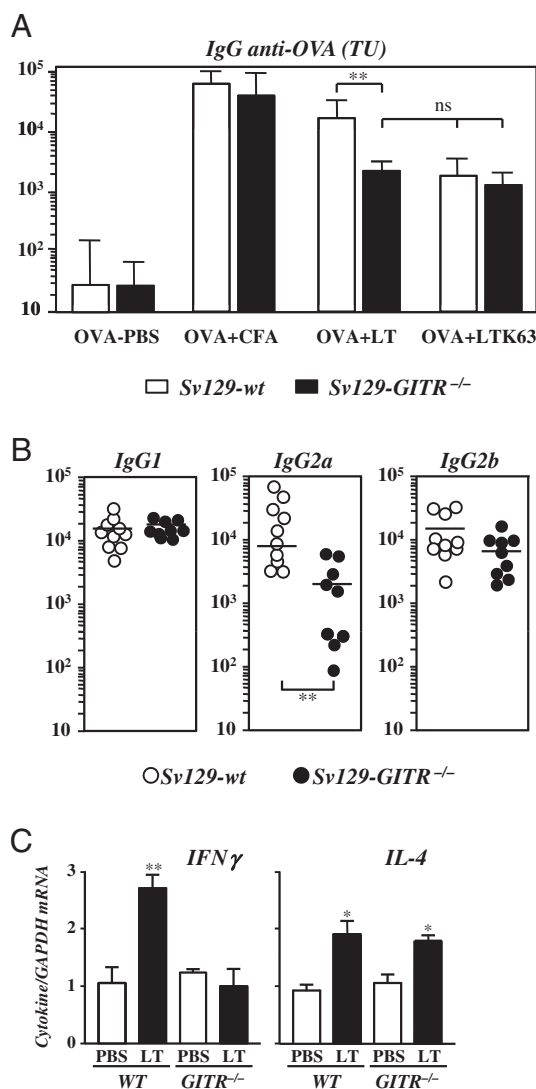


Figure 5. The expression of GITR in T cells modulates the systemic adjuvanticity of LT. (A) Two-month-old *Sv129-GITR^{-/-}* and WT littermates were immunized i.p. and boosted 20 days later with 100 μ g of OVA dissolved in saline or coadministered with either 1 μ g of LT or 5 μ g of OVA emulsified in CFA and boosted with 100 μ g of OVA emulsified in IFA 20 days later. Bars represent the mean $\pm$ SEM of the titers of IgG anti-OVA Ab in sera 15 days after the boost. Results are representative of two independent experiments. (B) Levels of IgG1, IgG2a and IgG2b anti-OVA Ab in the same sera than (A). Values of individual mice are expressed in TU. Bars represent the mean value of each examination. Statistical differences between the groups, evaluated by the Mann-Whitney test, are indicated as follows: ns, non-significant, $^{**}p < 0.01$. (C) Expression of IFN- γ and IL-4 mRNA in the spleen of bilateral adrenalectomized BALB/c mice 5 days after f.p. injection of 1 μ g of LT evaluated by real-time quantitative RT-PCR. Results for each cytokine are normalized to GAPDH expression as expressed as the mean $\pm$ SD of five mice per group. Statistical differences between PBS- and LT-treated animals, evaluated by the Student's t-test, are indicated as follows: $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$.

observed in the spleen of *Sv129* WT mice 5 days after LT administration (Fig. 5C). The expression of IL-4 was also enhanced in the spleen of LT-treated *Sv129-GITR^{-/-}* mice, but the levels of IFN- γ mRNA were essentially identical to those of PBS-treated *Sv129-GITR^{-/-}* controls (Fig. 5C).

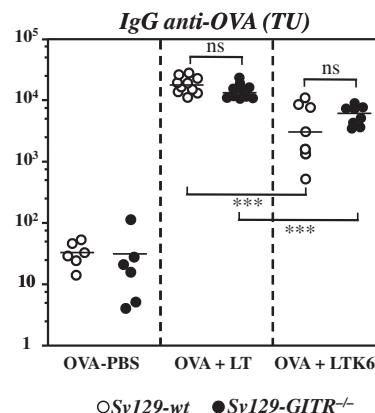


Figure 6. The expression of GITR in T cells does not influence the mucosal adjuvanticity of LT. (A) Two-month-old *Sv129-GITR^{-/-}* and WT littermates were immunized and boosted 21 days later i.n. with 10 μ g of OVA dissolved in PBS or coadministered with either 10 μ g of LT or LTK63. The levels of circulating IgG anti-OVA Ab were evaluated 15 days after the boost. Values of individual mice are expressed in TU. Bars represent the mean value of each examination. Statistical differences between the groups, evaluated by the Mann-Whitney test, are indicated as follows: ns, non-significant, $^{***}p < 0.001$.

We finally compared the mucosal adjuvanticity of LT and LTK63 between WT and *Sv129-GITR^{-/-}* mice immunized and boosted i.n. with OVA dissolved in either PBS, 10 μ g of LT or LTK63. No differences in the levels of circulating IgG, IgA or the different IgG subclass (Fig. 6 and data not shown) anti-OVA Ab were observed between LT-OVA i.n. immunized WT and *Sv129-GITR^{-/-}* mice 14 days after the boost. Serum levels of IgG anti-OVA Ab were also similar between WT and *Sv129-GITR^{-/-}* mice immunized i.n. with LTK63-OVA but significantly lower ($p < 0.001$) than those observed in mice receiving LT as adjuvant (Fig. 5B).

Discussion

The unique property of LT to act as a potent mucosal and systemic adjuvant has stimulated many studies aimed at understanding its mechanism of action [21]. In this study, we demonstrate that LT induces the expression of GITR, but not other activation markers, on T cells when administered systemically by a mechanism that requires the enzymatic activity of the toxin and is independent of endogenous glucocorticoids. This effect seems specific for LT as it is not observed with other commonly used adjuvants or immune stimulators. The induction of GITR expression in CD4 $^{+}$ T cells accounts for the systemic adjuvanticity of LT which is associated to its enzymatic activity. Finally, the inability of LT to promote GITR expression in Peyer's patch T cells after its mucosal administration and the fact that WT and *GITR^{-/-}* mice respond equally to i.n. administered antigens using either LT or LTK63 as adjuvants, clearly indicates that the mechanisms of adjuvanticity of these toxins are highly influenced by their route of administration.

We describe a novel mechanism of systemic adjuvanticity of LT linked with the capacity of the toxin to induce the expression of key

costimulatory molecules, such as GITR, in CD4⁺ T cells. As LT causes apoptosis of mature lymphocytes, the accumulation of CD4⁺ GITR^{high} cells after toxin administration may reflect a particular resistance of this cell population to cell death signals, as it has been suggested previously [22]. It is theoretically possible that in situations where the ability of LT to promote T-cell apoptosis is inhibited, the relative proportion of CD4⁺ GITR^{high} and CD4⁺ GITR^{low} cells will be close to that observed in untreated mice and that such resistance will not be observed in mice deficient in GITR. However, although we cannot totally exclude this possibility, our results demonstrate a similar susceptibility of CD4⁺ T cells from Sv129 WT and GITR^{-/-} mice to LT-induced apoptosis and an expansion of CD4⁺ GITR^{high} cells in both bilateral adrenalectomized BALB/c mice and B6 mice overexpressing in T cells FADD-DN and hBcl-2 transgenes, which are largely protected against LT-induced apoptosis of mature T cells [3, 16].

In view of the role of GITR in T cells, GITR signaling may contribute to the adjuvanticity of LT by acting as an activation-induced costimulatory signal in CD4⁺CD25⁻ T cells that increase their TCR-induced proliferation and cytokine production [17]. Signaling through GITR may also inhibit the suppressive capacity of Treg [18] or may render CD4⁺CD25⁻ T cells more resistant to the Treg-mediated suppression [17], also contributing in that way to the immunostimulatory capacity of LT. However, against this last possibility is the fact that LT interferes with the establishment of lymphocyte tolerance in a model in which such tolerance induction is independent of Treg activity. Alternatively, the induction of GITR expression in CD4⁺ T cells may influence the adjuvanticity of LT by regulating the activity of DC. GITR is activated by its ligand (GITRL), which is expressed in APC [17]. Although our preliminary observations fail to show changes in the expression of GITRL on APC after LT administration (our unpublished observations), it is also possible that GITRL, interacting with the upregulated GITR receptor in T cells, may deliver signals to APC by means of its cytoplasmic domain [19]. In this regard, DC cocultured with activated CD4⁺ T cells from GITR^{-/-} mice and stimulated with heat-inactivated *Candida albicans* produce high amounts of IL-12 [23]. However, this Th1 polarization observed in GITR^{-/-} mice during *C. albicans* immune responses clearly contrasts with the reduction in the levels of circulating IgG2a (the classical Th1 IgG subclass) anti-OVA Ab and with the absence of induction of IFN- γ gene expression in the spleen of these LT-treated GITR^{-/-} mice. Whether the different nature of these two antigens may explain these apparently conflicting observations is at present unknown.

LT retains, although at decreased levels, a prominent systemic immunostimulatory capacity in GITR^{-/-} mice that is similar in intensity to the adjuvanticity of LTK63 in WT and GITR^{-/-} mice. Thus, other still unknown mechanisms have to be involved in the capacity of LT to stimulate the immune system, mechanisms which are very likely shared by the LTK63 mutant and which may be linked to the holotoxin structure or to their receptor binding capacity. In particular, GM1 crosslinking induces the activation of T cells, and the B subunit of CT or LT is capable of substituting for costimulation during T-cell activation or to elicit humoral immune responses in mice, respectively [24–27]. However, the B

subunit of LT promotes the induction of immunological tolerance to antigens co-administered orally [28], suggesting that the crosslinking of GM1 by LT or LTK63 may contribute to the adjuvanticity of these toxins only in certain experimental conditions.

Unlike the systemic route, the mucosal administration of LT does not induce the expression of GITR on T cells in both Peyer's patches and draining mesenteric lymph nodes. In agreement with these results, no differences in the LT adjuvanticity are observed between WT and GITR^{-/-} mice. As LT promotes a rapid and strong upregulation of GITR expression in Peyer's patches CD4⁺CD25⁻ T cells *in vitro*, the effects observed *in vivo* are unrelated to the presence of intrinsic defects in these mucosal T cells. Although doses of LT 10–50 times higher than those used systemically and administered with neomycin fail to induce GITR expression in T cells, such absence of GITR induction after mucosal delivery of LT may be due to the differences in the availability of the toxin when given parenterally or mucosally secondary to an enhanced degradation of the toxin. However, the fact that these high doses of LT administered i.n. have a strong immunostimulatory activity against co-administered antigens clearly indicates that the mucosal adjuvanticity of LT is unrelated to GITR. Thus, our results provide evidences that the mechanisms of adjuvanticity of LT are highly influenced by the route of administration of the toxin. Other groups have demonstrated that the i.g. administration of CT enhances the expression of B7-2 molecule on B cells and macrophages and that this induction is critical for the mucosal adjuvanticity of the toxin [29]. However, it remains unclear whether a similar upregulation of B7-2 expression is observed after mucosal or systemic administration of LT.

In summary, in this study, we have demonstrated that distinct mechanisms can be in place when adjuvants such as LT are administered parenterally or mucosally. In fact, the systemic adjuvanticity of LT, which is linked to its enzymatic activity, is mediated through the regulation of GITR expression in CD4⁺ T cells. The induction of Bell's palsy in some healthy subjects receiving i.n. LT or LT mutants containing vaccines [8, 9] supports the possibility of using these adjuvants *via* the parenteral route. In this light, our study provides insights into the understanding of immunomodulatory properties of LT and related toxins that may lead to the harnessing of such activities in safer forms.

Materials and methods

Mice and surgery

BALB/c mice were obtained from Harland Iberica (Barcelona, Spain). B6.*prLck.hbcl-2* Tg mice were obtained by backcrossing C3H/HeN.*Lck.hbcl-2* Tg mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) with B6 mice. B6.*prLck.hbcl-2* Tg mice were crossed with B6 Tg mice overexpressing FADD-DN in T cells [30], generously provided by Dr. Andreas Strasser (The Walter and

Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia), to obtain double-Tg mice. Sv129-GITR^{-/-} mice were generated by homologous recombination as previously described [31].

Adrenal glands were removed as described [3]. LT toxin was administered 2 days after surgery.

All experiments were performed in 6–8 wk-old animals and approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee.

Adjuvants and immunization protocols

LT and their mutants, MF59 and aluminum hydroxide were obtained from Novartis Vaccines (Siena, Italy). The CFA and IFA were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The doses of LT and LT mutants used here were chosen according to our previous studies [3, 16]. For i.g. administration of toxins (10 or 50 µg of LT or 30 µg of LTK63), animals received previously 200 µL of 1 M carbonate-bicarbonate buffer and 100 µg of omeprazole (Sigma) and were maintained under neomycin treatment (SALVAT Laboratories, Barcelona, Spain), administered in the drinking water at a concentration of 5 mg/L).

DHGG and AHGG were prepared from HGG (Baxter S.L., Valencia, Spain) as described previously [20]. Mice were treated i.p. (BALB/c mice) or i.v. (Sv129 mice) with 3 mg of DHGG and boosted i.p. 10 days later with 400 µg of AHGG dissolved in saline (BALB/c mice) or emulsified in CFA (Sv129 mice). In some experiments, 50 µg of LPS, 1 or 0.1 µg of LT or 5 µg of LTK63 was injected i.p. 3 h after DHGG injection. The presence of IgG anti-HGG Ab in sera was measured by ELISA 7 days after the AHGG boost, as described [20].

In some experiments, Sv129-GITR^{-/-} mice and WT littermates were immunized i.p. with 100 µg of OVA together with either 1 µg of LT or 5 µg of LTK63. A similar boost was performed 20 days later. As a control, mice were immunized with 100 µg of OVA-CFA and boosted with 100 µg of OVA-IFA 20 days later. The mucosal adjuvanticity of toxins was tested by immunizing i.n. Sv129-GITR^{-/-} mice and WT littermates on days 0 and 21 with 10 µg of toxins and 10 µg of OVA, or with antigen alone. In all the experiments, the titers of IgA, IgG and IgG subclass-specific anti-OVA Ab in sera were measured by ELISA 15 days after the boost, as described [5].

Induction of apoptosis by LT

Sv129-GITR^{-/-} mice and WT littermates were injected into the f.p. with 1 µg of LT, and the induction of apoptosis of CD4⁺ T cells was evaluated 72 h later as described previously [3, 16].

Flow cytometry studies

Frequencies of lymphocyte populations were evaluated in the spleen, mesenteric lymph nodes or Peyer's patches by flow cytometry 48–72 h after the administration of toxins using

conjugated mAb (Becton Dickinson Biosciences, Madrid, Spain). Cells were analyzed using a FACScalibur flow cytometer using the Cell Quest Pro software (Becton Dickinson).

CD4⁺CD25⁻ T-cell purification and *in vitro* assay

Purified CD4⁺CD25⁻ spleen cells, using the mouse CD4⁺ isolation kit (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain) or total Peyer's patches, inguinal or mesenteric lymph node cells (5×10^5 cells/well) from 2-month-old BALB/c were either non-stimulated (medium) or stimulated *in vitro* with LT (0.5 µg/mL) during 24 h. GITR expression on viable cells was evaluated by flow cytometry.

In vivo proliferation assay

Mice received an i.p. injection of 1 mg of BrdU (Sigma) prior to the treatment with 1 µg LT and maintained with BrdU in the drinking water (0.8 mg/mL) during the following 3 days. The incorporation of BrdU in mature B and T spleen cells was evaluated by flow cytometry 72 h after LT administration, as described previously [32].

Treatment with mAb

For CD4⁺CD25⁺ T-cell depletion, mice received one daily i.p. injection of 0.2 mg of anti-CD25 mAb (clone PC61) during 3 days 1 wk before the immunization with AHGG or DHGG. The efficiency of the treatment was confirmed by flow cytometry. In some experiments, mice received i.p. 1 mg of an agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) [18], generously provided by Dr. Simon Sakaguchi (Kyoto University, Kyoto, Japan), at the time of DHGG tolerization.

Real-time RT-PCR assays

Total RNA was obtained from the spleen of bilateral adrenalectomized Sv129-GITR^{-/-} mice and WT littermates 5 days after i.p. injection of 1 µg of LT or PBS and used for cDNA synthesis with a RT-PCR kit (Fermentas, Quimigen S.L., Madrid). Quantitative real-time PCR was conducted on a MX-3000P Stratagene instrument (La Jolla, CA, USA) using specific TaqMan POMC expression assays (Applied Biosystems, Life Technologies). The results (in triplicate) were normalized to GAPDH expression. Data were expressed as mean fold change relative to control samples ($n = 5$ mice/group).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the two-tailed Student's *t*-test or the Mann-Whitney test. Probability values <0.05 were considered significant.

Acknowledgements: We thank Maria Aramburu and Natalia Cobo for technical assistance. This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain to RM (SAF2008-02042) and JM (SAF2006-12520-C02-02 and BFU2009-07206), from the Fundación Marqués de Valdecilla, Spain to JM (API-07/02), by a research agreement sponsored by Novartis Vaccines and Diagnostics (to R. M. and J. M.), by grant REDINREN RD06/0016 from the “Instituto de Salud Carlos III” to R. M. and by grant no LSHP-CT-2003–503240 (MUVAPRED, Mucosal Vaccines for Poverty Related Diseases) from the “European Commission” to G. D. G. and R. R.

Conflict of interest: With the exception of Rino Rappuoli and Giuseppe del Giudice, who are full-time employees of Novartis Vaccines and Diagnostics, Siena, Italy, the authors have no conflicting financial interests.

References

- Freytag, L. C. and Clements, J. D., Mucosal adjuvants. *Vaccine* 2005. **23**: 1804–1813.
- Rappuoli, R., Pizza, M., Douce, G. and Dougan, G., Structure and mucosal adjuvant activity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol. Today* 1999. **20**: 493–500.
- Tamayo, E., Merino, R., González-Rojas, J., Marquina, R., Santiuste, I., Amado, J. A., Rappuoli, R. et al., The *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin induces apoptosis of immature lymphocytes in vivo via a glucocorticoid-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005. **35**: 3505–3515.
- Douce, G., Giannelli, V., Pizza, M., Lewis, D., Everest, P., Rappuoli, R. and Dougan, G., Genetically detoxified mutants of heat-labile toxin from *Escherichia coli* are able to act as oral adjuvants. *Infect. Immun.* 1999. **67**: 4400–4406.
- Giuliani, M. M., Del Giudice, G., Giannelli, V., Dougan, G., Douce, G., Rappuoli, R. and Pizza, M., Mucosal adjuvant activity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. *J. Exp. Med.* 1998. **187**: 1123–1132.
- Peppoloni, S., Ruggiero, P., Contorni, M., Morandi, M., Pizza, M., Rappuoli, R., Podda, A. and Del Giudice, G., Mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 2003. **2**: 285–293.
- van Ginkel, F. W., Jackson, R. J., Yuki, Y. and McGhee, J. R., The mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J. Immunol.* 2000. **165**: 4778–4782.
- Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R. T., Linder, T., Spyr, C. and Steffen, R., Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N. Engl. J. Med.* 2004. **350**: 896–903.
- Lewis, D. J. M., Huo, Z., Barnett, S., Kromann, I., Giemza, R., Galiza, E., Woodrow, M. et al., Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of *Escherichia coli* heat labile toxin. *PLoS ONE* 2009. **4**: e6999.
- Simmons, C. P., Mastroeni, P., Fowler, R., Ghaem-maghami, M., Lycke, N., Pizza, M., Rappuoli, R. and Dougan, G., MHC class I-restricted cytotoxic lymphocyte responses induced by enterotoxin-based mucosal adjuvants. *J. Immunol.* 1999. **163**: 6502–6510.
- Neidleman, J. A., Vajdy, M., Ugozzoli, M., Ott, G. and O'Hagan, D., Genetically detoxified mutants of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* are effective adjuvants for induction of cytotoxic T-cell responses against HIV-1 gag-p55. *Immunology* 2000. **101**: 154–160.
- Grdic, D., Ekman, L., Schön, K., Lindgren, K., Mattsson, J., Magnusson, K. E., Ricciardi-Castagnoli, P. and Lycke, N., Splenic marginal zone dendritic cells mediate the cholera toxin adjuvant effect: dependence on the ADP-ribosyltransferase activity of the holotoxin. *J. Immunol.* 2005. **175**: 5192–5202.
- Gagliardi, M. C., Sallusto, F., Marinaro, M., Langenkamp, A., Lanzavecchia, A., and De Magistris, M. T., Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* 2000. **30**: 2394–2403.
- Anjuère, F., Luci, C., Lebens, M., Rousseau, D., Hervouet, C., Milon, G., Holmgren, J. et al., In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *J. Immunol.* 2004. **173**: 5103–5111.
- Yamamoto, M., Kiyono, H., Yamamoto, S., Batanero, E., Kweon, M. N., Otake, S., Azuma, M. et al., Direct effects on antigen-presenting cells and T lymphocytes explain the adjuvant activity of a nontoxic cholera toxin mutant. *J. Immunol.* 1999. **162**: 7015–7021.
- Tamayo, E., Postigo, J., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Benito, A., Yagita, H., Merino, R. and Merino, J., Involvement of the intrinsic and extrinsic cell death pathways in the induction of apoptosis of mature lymphocytes by the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Eur. J. Immunol.* 2009. **39**: 439–446.
- Ronchetti, S., Zollo, O., Bruscoli, S., Agostini, M., Bianchini, R., Nocentini, G., Ayroldi, E. and Riccardi, C., GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur. J. Immunol.* 2004. **34**: 613–622.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. and Sakaguchi, S., Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 135–142.
- Lee, H. S., Shin, H. H., Kwon, B. S. and Choi, H. S., Soluble glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (sGITR) increased MMP-9 activity in murine macrophage. *J. Cell Biochem.* 2003. **88**: 1048–1056.
- Weigle, W. O., Scheuer, W. V., Hobbs, M. V., Morgan, E. L. and Parks, D. E., Modulation of the induction and circumvention of immunological tolerance to human gamma-globulin by interleukin 1. *J. Immunol.* 1987. **138**: 2069–2074.
- Cox, E., Verdonck, F., Vanrompay, D. and Goddeeris, B., Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. *Vet. Res.* 2006. **37**: 511–539.
- Nocentini, G., Giunchi, L., Ronchetti, S., Krausz, L. T., Bartoli, A., Moraca, R., Migliorati, G. and Riccardi, C., A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. **94**: 6216–6221.
- Agostini, M., Cenci, E., Pericolini, E., Nocentini, G., Bistoni, G., Vecchiarelli, A. and Riccardi, C., The glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related gene modulates the response to *Candida albicans* infection. *Infect. Immun.* 2005. **73**: 7502–7508.

- 24 Norihisa, Y., McVicar, D. W., Ghosh, P., Houghton, A. N., Longo, D. L., Creekmore, S. P., Blake, T. et al., Increased proliferation, cytotoxicity, and gene expression after stimulation of human peripheral blood T lymphocytes through a surface ganglioside (GD3). *J. Immunol.* 1994. **152**: 485–495.
- 25 Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y. and Lanzavecchia, A., T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 1999. **283**: 680–682.
- 26 Richards, C. M., Aman, A. T., Hirst, T. R., Hill, T. J. and Williams, N. A., Protective mucosal immunity to ocular herpes simplex virus type 1 infection in mice by using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit as an adjuvant. *J. Virol.* 2001. **75**: 1664–1671.
- 27 Tamura, S., Funato, H., Nagamine, T., Aizawa, C. and Kurata, T., Effectiveness of cholera toxin B subunit as an adjuvant for nasal influenza vaccination despite pre-existing immunity to CTB. *Vaccine* 1989. **7**: 503–505.
- 28 Holmgren, J. and Czerkinsky, C., Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 2005. **11**: S45–53.
- 29 Cong, Y., Weaver, C. T. and Elson, C. O., The mucosal adjuvanticity of cholera toxin involves enhancement of costimulatory activity by selective up-regulation of B7.2 expression. *J. Immunol.* 1997. **159**: 5301–5308.
- 30 Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G. and Strasser, A., A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* 1998. **17**: 706–718.
- 31 Ronchetti, S., Nocentini, G., Riccardi, C. and Pandolfi, P. P., Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 2002. **100**: 350–352.
- 32 Shen, H., Boyer, M. and Cheng, T., Flow cytometry-based cell cycle measurement of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Methods Mol. Biol.* 2008. **430**: 77–86.

Abbreviations: AHGG: aggregated HGG · B6: C57BL/6 · CT: *Vibrio cholerae* toxin · DHGG: monomeric-deaggregated human gammaglobulin · FADD-DN: dominant negative form of FADD · f.p.: footpad · GITR: glucocorticoid-induced TNFR-related protein · GITR^{-/-}: GITR deficient · hBcl-2: human Bcl-2 · LT: *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin

Full correspondence: Dr. Ramón Merino, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria-IDICAN, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain
Fax: +34-942-201945
e-mail: merinor@unican.es

Additional correspondence: Dr. Jesús Merino, Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain
e-mail: merinoj@unican.es

Received: 3/8/2009
Revised: 21/10/2009
Accepted: 26/11/2009

Involvement of the intrinsic and extrinsic cell-death pathways in the induction of apoptosis of mature lymphocytes by the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin

Esther Tamayo¹, Jorge Postigo¹, Giuseppe Del Giudice²,
Rino Rappuoli², Adalberto Benito³, Hideo Yagita⁴, Ramón Merino^{*1,5}
and Jesús Merino^{*1}

¹ Department of Molecular Biology, University of Cantabria, Santander, Spain

² Novartis Vaccines and Diagnostics, Siena, Italy

³ Research Unit and Nephrology, IFIMAV, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

⁴ Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

⁵ Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Cantabria-IDICAN, Santander, Spain

Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) exhibits a broad range of immunomodulatory activities, including the induction of lymphocyte-programmed cell death. In previous studies, we have demonstrated that *in vivo* LT promotes apoptosis of immature T and B cells through the stimulation of endogenous glucocorticoids. In the present study, we show that the extrinsic cell-death pathway as well as the apoptosis-inducing factor do not participate in the LT-induced elimination of thymocytes. In contrast to developing lymphocytes, LT promotes the death of mature lymphocytes by both glucocorticoid- and Fas death receptor/Fas ligand-dependent mechanisms. However, the dependency of these mechanisms in the LT-induced cell-death activity seems to be different among CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Altogether, our study shows that the same bacterial toxin can induce apoptosis of lymphoid cells through several mechanisms depending on the status of differentiation of these cells.

Key words: Apoptosis · Bcl-2 · *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin · Fas · Glucocorticoids

Introduction

The *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT) and *Vibrio cholerae* toxin cause diarrhoea in infected humans. However, when co-administered with antigens they exhibit powerful mucosal and systemic adjuvanticity [1, 2]. Both toxins consist of a homo-pentameric ring of B subunits, which binds to the

oligosaccharide portion of the cell-surface ganglioside GM1, and mediates the endocytosis of the toxin, and of a monomeric A subunit, which catalyses the transfer of an adenosine diphosphate (ADP) ribose from NAD⁺ to trimeric G proteins [3]. This activity results in a persistent activation of adenylate cyclase and increase in cytosolic cAMP [4], which disrupts cell homeostasis with a variety of toxic effects, depending on the cell type, that include alteration in lymphokine production and even cell death [5–7]. In experiments originally undertaken to understand the mechanisms of adjuvanticity of this toxin, we recently found

Correspondence: Dr. Jesús Merino
e-mail: merinoj@unican.es

*These authors contributed equally to this work.

that when administered parenterally LT promotes apoptosis of immature T and B cells by a mechanism, independent of Fas and TNFR1, which involves endogenous glucocorticoids and is partially inhibited by Bcl-2 overexpression [7]. We have also demonstrated that the LT-mediated programmed cell death requires the enzymatic activity of the toxin, since a mutant devoid of enzymatic activity has no pro-apoptotic effect [7]. However, the possible involvement of additional cell-death receptors and of caspase-independent apoptotic pathways in this LT activity remains unknown.

This preliminary work demonstrated that LT has a pleiotropic activity, acting as a toxin at gastrointestinal level (thereby inducing diarrhoea), as an adjuvant at mucosal and parenteral level (thereby acting as an “immuno-potentiator”), and as a pro-apoptotic agent at parenteral level. Infection with enterotoxigenic *E. coli* is confined at the enteric level, and LT is not expected to exert systemic effects during the natural infection. The results of the first set of experiments [7] suggested, thus, that LT may exhibit more extended biological effects than expected. This prompted us to extend the investigation of the apoptotic effects exerted by this toxin.

In addition to the induction of apoptosis of developing T and B cells, LT is able to promote cell death in mature lymphocytes that *in vitro* is more marked in the CD8⁺ subpopulation [7–9]. The LT-induced apoptosis of CD8⁺ T cells *in vitro* is preceded by a rapid nuclear translocation of NFκB, resulting in the increase of c-myc expression and the early activation of caspase 8 [8, 9]. However, this early activation of caspase 8 seems independent of Fas and TNFR engagement [9]. Altogether, these results suggest that different cell-death pathways may account for the elimination of immature and mature lymphocytes after LT administration.

In the present study we have explored the involvement of the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways as well as the possible contribution of caspase-independent cell-death mechanisms in the *in vivo* pro-apoptotic effect of LT on immature and mature T cells. Our results demonstrate that unlike its effects on immature lymphocytes [7], LT promotes apoptosis of mature T cells by mechanisms that involve both the intrinsic and the extrinsic cell-death pathways.

Results and discussion

LT promotes apoptosis of thymocytes by a caspase-dependent mechanism that does not involve cell-death receptors and AIF

We recently demonstrated that the systemic administration of LT promoted the elimination by apoptosis of T (mostly double positive thymocytes) and B (mostly pre-B and immature B cells) progenitors in the thymus and bone marrow, respectively [7]. This apoptosis was mediated by endogenous glucocorticoids and was partially inhibited by the overexpression of human Bcl-2 (hBcl-2) but not by the absence of Fas or TNFR1 signalling.

However, at that time we did not investigate the possible participation of other cell-death receptor/ligand pairs, such as DR5/TRAIL, and of mitochondrial-dependent, but caspase-independent, cell-death mechanisms, like those mediated by the mitochondrial release and nuclear translocation of the apoptosis-inducing factor (AIF), in the pro-apoptotic activity of LT. To address these questions, 1 µg of LT was injected into the footpad (fp.) of C57BL/6 (B6) Tg mice overexpressing in T cells a dominant negative form of Fas-associated death domain (FADD-DN) and B6 mice deficient in AIF (AIF^{−/−}) at the level of T cells [10, 11] and the number of the different thymocyte subpopulations were examined 72 h later by flow cytometry. B6 WT mice and B6 Tg mice overexpressing in T cells hBcl-2 [12] were used as controls. As previously reported [7], B6 WT mice treated with LT exhibited a severe reduction in all thymocyte subpopulations, which was more prominent in double positive thymocytes (Fig. 1A), arguing against the possibility that the preferential elimination of double positive thymocytes caused by LT was secondary to an enhanced differentiation of these cells towards single positive stages of development. The LT-induced thymocyte depletion occurred at a similar extent in the thymus of T-cell FADD-DN Tg and T-cell AIF^{−/−} B6 mice (Fig. 1A). As expected [7], thymocytes from mice overexpressing hBcl-2 in T cells were partially protected against LT-induced apoptosis (Fig. 1A).

The possible involvement of caspases in the LT-induced apoptosis of thymocytes was supported by the observation of an enhanced caspase 3 activation and poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP) degradation, a classical marker of caspase activation [13], 12 and 24 h after treatment of B6 mice with LT (Fig. 1B and C). The detection of low levels of caspase 3 activation and PARP degradation in the thymus of PBS-treated controls could be secondary to the extensive apoptosis occurring physiologically during T-cell development (Fig. 1B and C). Our present and previous results are then consistent with a model where the induction of glucocorticoid production by LT, probably through a direct effect on glucocorticoid-secreting adrenal cells [7, 14], induced the death of immature lymphocytes through mitochondrial- and caspase-dependent mechanisms.

Role of the intrinsic cell-death pathway in the LT-induced apoptosis of mature lymphocytes

In addition to the induction of cell death in developing lymphocytes, LT caused an important reduction in mature T and B cells in the spleen of B6 mice (Fig. 2A). Since LT also promoted the massive elimination of developing T and B cells (Fig. 1A) [7], we analyzed whether the LT-induced reduction of mature lymphocytes observed in the spleen of B6 mice was secondary to the induction of cell death and/or to the selective depletion of recent lymphoid emigrants arriving at the spleen from primary lymphoid organs. To this end, BrdU was administered to B6 mice prior to and after the injection of LT and the number of T and B cells in the spleen was analyzed 72 h later

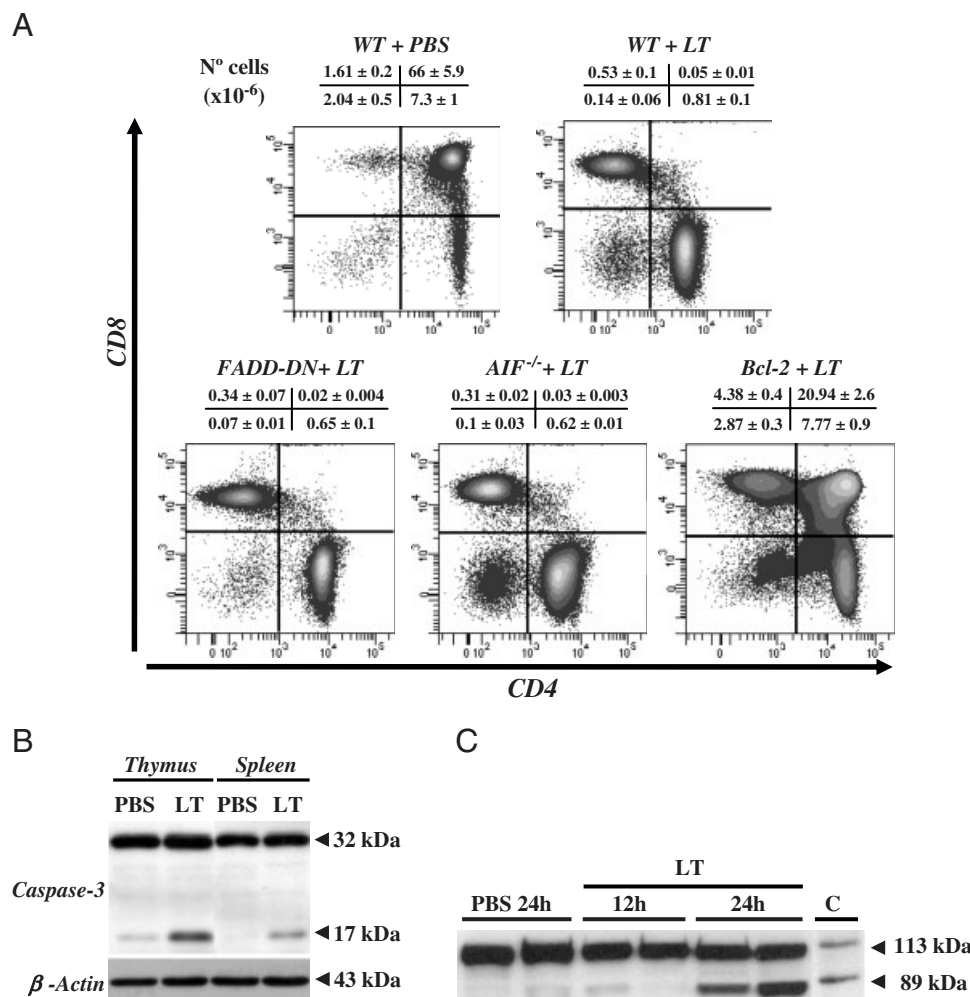


Figure 1. Role of the caspase-dependent intrinsic cell-death pathway in the induction of thymocyte apoptosis by LT. (A) Two -month-old WT, T-cell FADD-DN Tg, T-cell AIF^{-/-}, and T-cell hBcl-2 Tg B6 mice were injected into the fp. with 1 μ g of LT or PBS in a final volume of 50 μ L. Thymocytes were evaluated 3 days later by flow cytometry. The numbers of the different thymocyte subpopulations are indicated as the mean $\pm$ SD. Results are representative of at least three independent experiments ($n = 4$ mice in each experiment). (B) Activation of caspase 3 in thymocytes and spleen cells 12 h after fp. administration of 1 μ g of LT or PBS in a final volume of 50 μ L. The activation of caspase 3, evidenced by the presence of a 17 kDa band, was analyzed by Western blot. The expression of β -actin in these lysates is shown as a protein loading control. Results are representative of two independent experiments. (C) Degradation of PARP in thymocytes 12 and 24 h after fp. administration of 1 μ g of LT or PBS. The degradation of PARP, evidenced by the presence of an 89 kDa band, was analyzed by Western blot. Lysates from thymocytes cultured for 18 h in the presence of 1 μ M of dexamethasone were used as a positive control (C). Results are representative of two independent experiments.

within the BrdU⁺ (recent emigrants) and BrdU⁻ (non-recent emigrants) mature lymphocyte populations. Although the reduction of T and B cells was more marked in the BrdU⁺ population, LT also caused an important elimination of mature BrdU⁻ lymphocytes (Fig. 2A). This elimination occurred by apoptosis, as clearly shown by 7-amino-actinomycin (7AAD)/annexin-V double staining of mature T cells in the spleen of LT-treated B6 mice (Fig. 2B). In addition, LT promoted the activation of caspase 3 and the degradation of PARP in the spleen of B6-treated mice (Figs. 1C and 2B). The depletion of mature lymphocytes by LT *in vivo* also required its enzymatic activity, since the enzymatically inactive LTK63 mutant failed to induce apoptosis [7].

To explore the mechanisms responsible for this LT effect, the capacity of the toxin to promote apoptosis of mature B and T cells

has been explored first in B6 mice after bilateral adrenalectomy. Similar to that described for developing lymphocytes, the removal of both adrenal glands results in a significant reduction in the percentage of CD4⁺, CD8⁺, and B lymphocytes that are eliminated in the spleen after LT administration (Fig. 2C; $p < 0.01$ in all cases). These results point to endogenous glucocorticoids as important mediators of LT-induced cell death also in mature lymphocytes. In fact, treatment of B6 mice with the glucocorticoid receptor antagonist Mifepristone [15] inhibits LT-induced apoptosis of mature lymphocytes at an extent similar to bilateral adrenalectomy (Fig. 2C). It is interesting to note that the dependency on endogenous glucocorticoids for the pro-apoptotic activity of LT appears to be lower for CD8⁺ T cells than for CD4⁺ and B lymphocytes. Thus, while the bilateral adrenalectomy

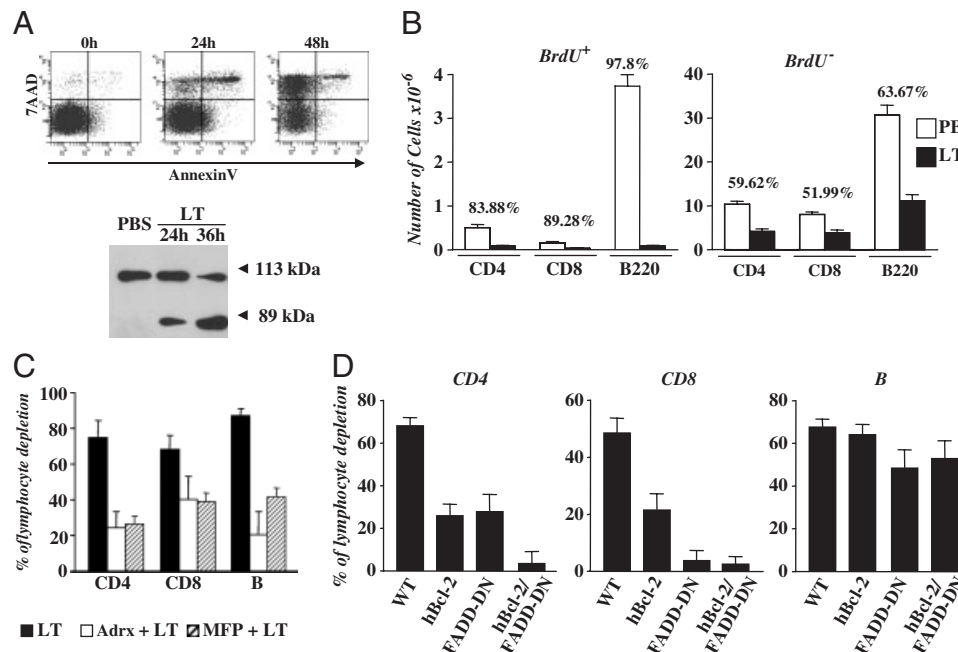


Figure 2. Involvement of endogenous glucocorticoids and cell-death receptors in the caspase-dependent LT-induced apoptosis of mature lymphocytes. (A) Two-month-old B6 mice received BrdU prior to and after the fp. injection of 1 μ g of LT or PBS. The numbers of BrdU⁺ and BrdU⁻ CD4⁺, CD8⁺, and B220⁺ spleen cells, expressed as the mean $\pm$ SD (5–7 animals/group), were analyzed 72 h after LT administration. The percentages of reduction of each cell population in the LT-treated mice in comparison to PBS-treated controls are indicated. Results are representative of at least two independent experiments. (B) Upper panels: 7-AAD and Annexin-V double staining of gated CD3⁺ spleen cells from B6 mice 0 and 24 h after the injection of 1 μ g of LT, showing the early (Annexin-V⁺7-AAD⁻) and late (Annexin-V⁺7-AAD⁺) apoptotic cells. Lower panel: degradation of PARP, evidenced by the presence of an 89 kDa band, in spleen cells 24 and 36 h after fp. administration of 1 μ g of LT. (C) Adrenal glands from 2-month-old B6 mice were either removed unilaterally (LT) or bilaterally (Adrx+LT) 96 h prior to injection into the fp. of PBS or 1 μ g of LT or PBS. In parallel, a group of non-adrenalectomized B6 mice was treated for 4 consecutive days with 125 mg/kg/day of mifepristone (MFP+LT). On day 2, mice were injected into the fp. with PBS or 1 μ g of LT in a final volume of 50 μ L. (D) Two-month-old WT, T-cell FADD-DN Tg, T-cell hBcl-2 Tg, and T-cell FADD-DN/hBcl-2 double-Tg B6 mice were injected into the fp. with 1 μ g of LT or PBS. In (C) and (D), the number of mature CD4⁺, CD8⁺ and B cells in each experimental group (5–7 animals/group) was evaluated in the spleen 72 h after toxin administration. Results are representative of at least two independent experiments and are expressed as the mean $\pm$ SD of the percentage of reduction of each cell population in the LT-treated mice in comparison to PBS-treated controls.

causes a 3.0- and 4.1-fold reduction in LT-induced apoptosis of CD4⁺ and B lymphocytes, respectively, this decrease is of only 1.6 times in the case of CD8⁺ T cells (Fig. 2C).

Consistent with a role of endogenous glucocorticoids in the pro-apoptotic effect of LT in mature lymphocytes, the overexpression in T cells of a hBcl-2 transgene but not the T-cell deficiency in AIF reduced significantly the pro-apoptotic effect of LT in mature T but not B lymphocytes expressing normal endogenous levels of both cell-death regulators (Fig. 2D and data not shown).

Role of the extrinsic cell-death pathway in the apoptosis of mature lymphocytes induced by LT

To assess the involvement of surface cell-death receptors in the pro-apoptotic activity of LT in mature lymphocytes, 1 μ g of this toxin was injected into the fp. of B6 Tg mice overexpressing a DN mutant of human FADD in T cells. WT B6 mice were employed as controls. Unlike double positive and single positive thymocytes (Fig. 1A), the overexpression of FADD-DN protected CD4⁺

splenocytes from LT-induced cell death ($p < 0.005$) at an extent similar to hBcl-2 overexpression (Fig. 2D; $p > 0.1$). Indeed, CD4⁺ T cells from double hBcl-2/FADD-DN T-cell Tg mice were almost totally protected against LT-induced cell death (Fig. 2D). In these Tg mice, B cells that did not express any of the transgenes were eliminated after LT administration at a degree similar to that observed in WT mice (Fig. 2D). Interestingly, the overexpression of FADD-DN prevented almost completely the elimination of CD8⁺ T cells caused by LT treatment ($p < 0.001$) and this protection did not increase significantly in double hBcl-2/FADD-DN T-cell Tg mice (Fig. 2D; $p > 0.1$). The protection against LT-induced apoptosis conferred by FADD-DN overexpression in mature spleen T cells clearly contrasted with the apparent absence of effect in single positive CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes (Fig. 1A). However, the reduction in the number of single positive thymocytes in LT-treated FADD-DN Tg mice might be explained by the dramatic effect of LT in double positive thymocyte precursors, blocking their differentiation towards single positive CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes. Alternatively, single positive CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes might constitute a transitional stage of development between double positive

thymocytes and mature peripheral T cells in which the extrinsic cell-death pathway did not play a role in the proapoptotic effect of LT. In this regard, the experiments with BrdU presented here demonstrated that the susceptibility to LT-induced apoptosis was higher in the BrdU⁺ T cell population (recent thymic emigrants) than in the more mature BrdU⁻ T cells (Fig. 2A).

We further explored the contribution of Fas/FasL-interaction (FasL), TNFR1/TNF, and DR5/TRAIL receptor/ligand interactions separately to the ability of LT to promote cell death of mature lymphocytes by injecting this toxin into FasL-deficient B6.gld/gld mice or into WT B6 mice treated or not with neutralizing anti-TNF or anti-TRAIL mAb. LT promoted apoptosis of mature T and B cells at a comparable extent in WT B6 mice treated or not with anti-TRAIL or anti-TNF mAb (Fig. 3A; $p > 0.1$). The presence of high levels of circulating anti-TNF and anti-TRAIL mAb 72 h after the administration of LT argued against the possibility that the doses of mAb injected in these treated mice were insufficient to effectively block TNF and TRAIL (Fig. 3B). Nevertheless, LT-induced apoptosis of mature lymphocytes was severely impaired in mice deficient in FasL (Fig. 3C). Again, the protection against the LT-induced apoptosis was higher in the CD8⁺ T cell population ($p < 0.01$) than in CD4⁺ T cells ($p < 0.05$).

An interesting observation of our study is that the dependency on endogenous glucocorticoids in the LT-induced apoptosis appears to be different in mature CD4⁺ T and B cells *versus* CD8⁺

T cells, probably reflecting a previously unidentified differential response of these cell populations to glucocorticoids *in vivo* [16]. This hypothetical reduced response to glucocorticoids of CD8⁺ T cells may also explain why the Fas/FasL interaction plays a predominant role in the elimination of this cell population after LT administration. In fact, the activation-induced T-cell apoptosis, a phenomenon mediated by Fas/FasL interaction [17], is known to be inhibited *in vitro* by glucocorticoids through the downregulation of FasL expression in T cells [18, 19]. This effect is controlled by the binding of ligand-bound glucocorticoid receptor to a negative glucocorticoid regulatory element within the *fasL* promoter [20, 21]. This site overlaps with a NF κ B-binding site, establishing a competition between ligand-bound glucocorticoid receptor and NF κ B for the regulation of FasL expression [21]. Interestingly, the *in vitro* treatment of CD4⁺ and CD8⁺ T cells with the B subunit of LT induces a rapid activation and nuclear translocation of NF κ B [9], which may interfere with the negative effect of glucocorticoids in the regulation of FasL expression and Fas-induced cell death of T cells. However, it is unknown whether such glucocorticoid and LT effects also occur *in vivo*. In this regard, we have been unable to detect changes in the expression of Fas and FasL in B, CD4⁺, and CD8⁺ mature spleen cells after the *in vivo* treatment with LT (data not shown). In addition, we cannot exclude that LT, directly or through the induction of glucocorticoid synthesis by the adrenal glands, modulate the production of FasL from other sources. In fact, the expression of FasL is not restricted to lymphoid cells and can

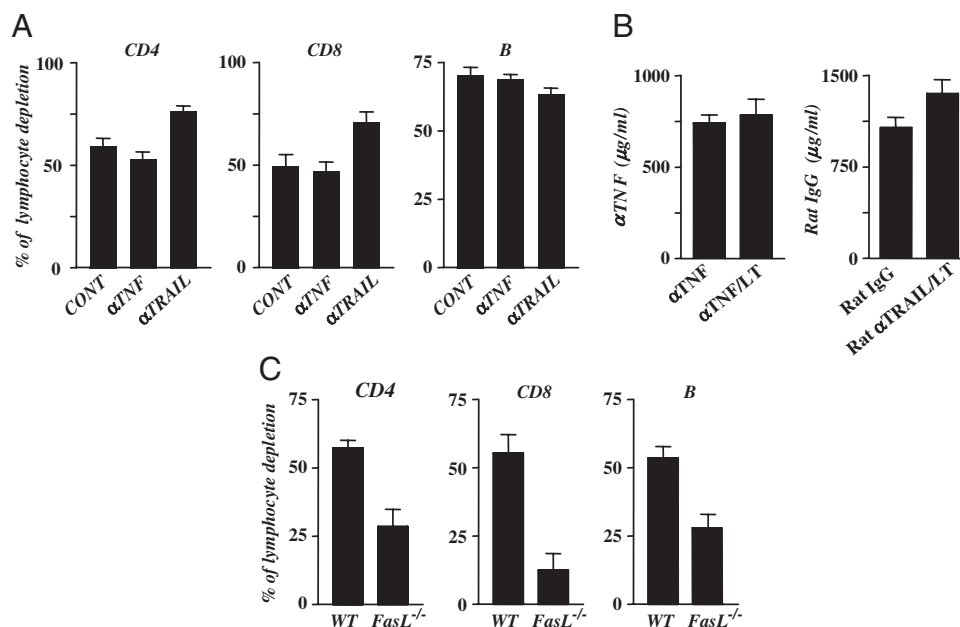


Figure 3. Involvement of Fas/FasL interaction in the LT-induced apoptosis of mature lymphocytes. (A) Groups of 2-month-old B6 mice (5 animals/group) treated with 3 mg of neutralizing anti-TNF or anti-TRAIL mAb or rat IgG as controls (CONT) were injected into the fp. with 1 μg of LT or PBS in a final volume of 50 μL. (B) Serum levels of anti-TNF mAb (right) and rat IgG (left, indicative of the presence of circulating anti-TRAIL mAb), at the time of the analysis as described in (A). Results (mean ± SD) are expressed in μg/mL. (C) Two-month-old B6 WT and B6.gld/gld (FasL^{-/-}) mice were injected into the fp. with 1 μg of LT or PBS in a final volume of 50 μL. In (A) and (C) the number of mature CD4⁺, CD8⁺ and B cells in each experimental group was evaluated in the spleen 72 h after toxin administration. Results are representative of at least two independent experiments and are expressed as the mean ± SD of the percentage of reduction of each cell population in the LT-treated mice in comparison to PBS-treated controls.

be found in different forms: as a surface molecule, as a protease-shed soluble variant, or secreted in vesicles [22]. Thus, the contribution of the LT-induced NF κ B activation in T cells and of the additional FasL sources in the Fas/FasL-dependent cell death of mature lymphocytes induced by LT as well as their implication in the different Fas/FasL and glucocorticoid cell-death susceptibility of mature CD4⁺ and CD8⁺ T cells after LT treatment remains to be determined.

Our present study further emphasizes the different apoptotic response to LT of T and B lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. We have previously showed that *in vivo* all lymphoid populations are affected by LT administration, although immature CD4⁺CD8⁺ T cells in the thymus and developing pre-B and immature B cells within the bone marrow are more susceptible [7]. In addition, distinct mechanisms account for the *in vivo* elimination of immature (intrinsic caspase-dependent cell-death pathways) *versus* mature lymphocytes (intrinsic and extrinsic caspase-dependent cell-death pathways) [7 and our present study]. In contrast, mature CD8⁺ T cells are more susceptible to LT-induced apoptosis than immature CD4⁺CD8⁺ or mature CD4⁺ T cells *in vitro* [8, 9]. The induction of CD8⁺ T cell apoptosis by LT *in vitro* correlates with the early activation of caspase 8 that is independent of Fas and TNFR engagement [8, 9]. Thus, it is very likely that differences in the experimental systems, the dose of toxin employed (much higher in the *in vitro* studies), as well as changes in the nature of the toxin preparations used in the different studies may be responsible for these apparently contradictory results.

Concluding remarks

In conclusion, our work has demonstrated that a bacterial toxin, in addition to exerting adjuvant activity, can also modulate the survival of lymphoid cells when administered parenterally. An effect of enterotoxigenic *E. coli* infection on the number of circulating lymphocytes is not evident. This may be due to the fact that the infection remains contained at the intestinal level and the LT does not produce systemic effects. Nevertheless, our work clearly shows that, when given parenterally, LT promotes apoptosis in mature peripheral T and B cells in addition to CD4⁺CD8⁺ thymocytes and pre-B and immature B cells in the thymus and bone marrow, respectively. Clearly, different apoptotic mechanisms are responsible for the elimination of these cell populations *in vivo*. While glucocorticoids are involved in the LT-induced caspase-dependent elimination of immature T and B cell progenitors, both endogenous glucocorticoids and Fas/FasL interactions mediate the apoptotic response in mature peripheral lymphocytes. We thereby provide insights into the understanding of immunomodulatory properties of LT and related toxins that may lead to the potential use of these toxins in conditions where the silencing of abnormal immune responsiveness may be desirable.

Materials and methods

Mice

B6 mice were obtained from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain). B6.*gld/gld* and C3H/HeN-*prLck.hbcl-2* Tg [12] mice were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). The *Lck.hbcl-2* transgene was transferred from the C3H/HeN to the B6 strain of mice by backcross procedures (more than 12 generations) in our animal facilities. B6 Tg mice expressing Cre-recombinase under the control of the CD4 promoter (*CD4-cre*) [23], B6 Tg mice overexpressing FADD-DN in T cells [10], and B6 mice with a conditional *Aif* allele [11] were a generous gift from Dr C. B. Wilson, University of Washington, Dr A. Strasser, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia, and Dr J. M. Penninger, Austrian Academy of Science, Austria, respectively. Mice with a targeted deletion of AIF in T cells were generated by crossing the *Aif*^{flox/+} mice with *CD4-cre* Tg mice. The screening of the different strains of mice was performed by PCR of genomic DNA extracted from mouse tails, as described previously [10–12, 23]. According to the initial description of the Tg mice used in our study (10–12), the absence of AIF expression in thymocytes and the overexpression of FADD-DN or hBcl-2 in thymocyte and peripheral T-cell subpopulations was verified by Western blot and flow cytometry, respectively (data not shown).

All studies with live animals were approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee.

Treatments

LT was produced, purified, and characterized at Novartis Vaccines, Siena, Italy. This toxin was found to be free of detectable LPS as determined by the Limulus Amebocyte Lysate assay (Sigma, St Louis, MO). Mice (2-month-old) were inoculated with 1 μ g of LT dissolved in PBS in a final volume of 50 μ L into the fp. Controls were treated with 50 μ L of PBS alone. The numbers of thymocyte subpopulations within the thymus and mature B and T cells in the spleen were analyzed 72 h later by flow cytometry. Mifepristone (RU38486, Sigma), a glucocorticoid receptor antagonist [15], was injected as described previously [7].

The hybridoma cell line V1q, secreting a neutralizing anti-TNF mAb [24], was kindly provided by Dr D. N. Männel (University of Regensburg, Germany). Neutralizing rat anti-mouse TRAIL mAb (N2B2) was prepared as described previously [25]. These mAb were injected intraperitoneally at a total dose of 3 mg/mice. Prior to their sacrifice for flow cytometry studies, mice were bled and the levels of circulating anti-TNF or anti-TRAIL mAb were measured by ELISA using plates coated with either recombinant mouse TNF- α (Preprotech, London, UK) or goat anti-rat IgG (Sigma), respectively. Plates incubated with

different dilutions of sera from treated and control mice were developed with an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG polyclonal Ab (Sigma). Results were expressed in $\mu\text{g/mL}$.

Adrenal glands were removed as described recently [7]. The control group underwent unilateral adrenalectomy. The LT toxin in these mice was administered 2 days after surgery.

In vivo BrdU labelling

Mice received an i.p. injection of 1 mg of BrdU (Sigma) prior to the treatment with 1 μg LT or PBS and maintained with BrdU in the drinking water (0.8 mg/mL) during the following 3 days. The incorporation of BrdU in mature B and T spleen cells was evaluated by flow cytometry 72 h after LT administration, as described previously [26].

Flow cytometry studies

Frequencies of lymphocyte subpopulations were evaluated by flow cytometry in cellular suspensions obtained from the thymus or spleen. The following rat anti-mouse mAb, obtained from Pharmingen (San Diego, CA), were used for cell-labelling conjugated to FITC, PE, or biotin: anti-CD3 (clone 145-2C11), anti-CD4 (clone GK-1.5), anti-CD8a (clone 53-6.7), anti-B220 (clone RA3.6B2), anti-Fas (clone Jo2) and anti-FasL (clone MFL3). When required, APC-StreptAvidin conjugates were used. The presence of cells undergoing apoptosis was assessed in cell suspensions by 7-AAD and Annexin-V double staining (Pharmingen), using standard protocols [7]. Cells were analyzed in all cases using a FACScanto flow cytometer with the FACSDiva software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Western blot

Whole protein lysates from the thymus and spleen of untreated and LT-treated mice at different time periods after toxin administration were prepared in a buffer containing 50 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 μM FNa, NP40 1%, 1 mM Na_3VO_4 , 1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, and 125 μM PMSF. Protein cell extracts were resolved by 12% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were incubated with anti-PARP-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-caspase 3 (Cell Signaling, Danvers, MA) or anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology) polyclonal antibodies followed by the appropriated secondary antibodies coupled to HRP (Jackson ImmunoResearch, Bar Harbor, ME). The levels of proteins were visualized by an enhanced chemiluminescence system (ECL system, Amersham Biosciences) and autoradiographed.

Statistical analysis

Statistical analysis of differences between groups of mice was performed using the Mann–Whitney test. $p < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgements: We thank Dr. C. B. Wilson (University of Washington, USA), Dr. J. M. Penninger (Austrian Academy of Science, Austria), and Dr. A. Strasser, (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Australia) for the different strain of mice, Dr. D. N. Männel (University of Regensburg, Germany) for the V1q anti-TNF hybridoma cell line, M. Aramburu and N. Cobo for technical assistance, and Dr. M. Lopez-Hoyos for comments about the manuscript. This work was supported by grant nos. SAF2005-00811 and SAF2006-12520-C02-02 from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain to R.M. and J.M., respectively, from the Fundación Marqués de Valdecilla (API-07/02), Spain to J.M., by a research agreement sponsored by Novartis Vaccines and Diagnostics (to R.M. and J.M.), by grant REDINREN RD06/0016 from the “Instituto de Salud Carlos III” to R.M. and by grant no. LSHP-CT-2003–503240 (MUVAPRED, Mucosal Vaccines for Poverty Related Diseases) from the European Commission to G.D.G. and R.R.

Conflict of interest: We declare that R.R. and G.D.G. are full-time employees of Novartis Vaccines and Diagnostics, Siena, Italy.

References

- 1 Mowat, A. M., Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 2003. 3: 331–341.
- 2 Wu, H. Y. and Weiner, H. L., Oral tolerance. *Immunol. Res.* 2003. 28: 265–284.
- 3 Sixma, T. K., Kalk, K. H., van Zanten, B. A., Dauter, Z., Kingma, J., Witholt, B. and Hol, W. G., Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J. Mol. Biol.* 1993. 355: 561–564.
- 4 Rappuoli, R., Pizza, M., Douce, G. and Dougan, G., Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol. Today* 1999. 20: 493–500.
- 5 Moss, J. and Vaughan, M., ADP-ribosylation of guanyl nucleotide-binding regulatory proteins by bacterial toxins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1988. 61: 303–379.
- 6 Hol, G. J. W., Sixma, K. S. and Merritt, A. E., Structure and function of *E. coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin B pentamer. in: Moss, J., Iglewski, B., Vaughan, M. and Tu, A. T., (Eds). *Handbook of Natural Toxins*. Marcel Dekker, Inc., New York 1995, pp 123–184.
- 7 Tamayo, E., Merino, R., González-Rojas, J., Marquina, R., Santiuste, I., Amado, J. A., Rappuoli, R. et al., The *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin induces apoptosis of immature lymphocytes *in vivo* via a glucocorticoid-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* 2005. 35: 3505–3515.

- 8 Soriani, M., Williams, N. A. and Hirst, T. R., Escherichia coli enterotoxin B subunit triggers apoptosis of CD8(+) T cells by activating transcription factor c-myc. *Infect. Immun.* 2001. **69**: 4923–4930.
 - 9 Salmond, R. J., Pitman, R. S., Jimi, E., Soriani, M., Hirst, T. R., Ghosh, S., Rincon, M. and Williams, N. A., CD8⁺ T cell apoptosis induced by Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit occurs via a novel pathway involving NF-kappaB-dependent caspase activation. *Eur. J. Immunol.* 2002. **32**: 1737–1747.
 - 10 Newton, K., Harris, A. W., Bath, M. L., Smith, K. G. and Strasser, A., A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J.* 1998. **17**: 706–718.
 - 11 Joza, N., Oudit, G. Y., Brown, D., Bénit, P., Kassiri, Z., Vahsen, N., Benoit, L. et al., Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biol.* 2005. **25**: 10261–10272.
 - 12 Sentman, C. L., Shutter, J. R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. and Korsmeyer, S. J., bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991. **67**: 879–888.
 - 13 Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., Earnshaw, W. C., Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 1994. **371**: 346–347.
 - 14 Donta, S. T., Moon, H. W. and Whipp, S. C., Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science* 1974. **183**: 334–336.
 - 15 Philibert, D. and Teutsch, G., RU 486 development. *Science* 1990. **247**: 622.
 - 16 Ashwell, J. D., Lu, F. W. M. and Vacchio, M. S., Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 2000. **18**: 309–345.
 - 17 Krammer, P. H., Arnold, R. and Lavrik, I. N., Life and death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2007. **7**: 532–542.
 - 18 Zacharchuk, C. M., Mercep, M., Chakraborti, P., Simons S. S., Jr. and Ashwell, J. D., Programmed T lymphocyte death: cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.* 1990. **145**: 4037–4045.
 - 19 Yang, Y., Mercep, M., Ware, C. F. and Ashwell, J. D., Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J. Exp. Med.* 1995. **181**: 1673–1682.
 - 20 Baumann, S., Dostert, A., Novac, N., Bauer, A., Schmid, W., Fas, S. C., Krueger, A. et al., Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimmer. *Blood* 2005. **106**: 617–625.
 - 21 Novac, N., Baus, D., Dostert, A. and Heinzel, T., Competition between glucocorticoid receptor and NFkB for the control of the human FasL promoter. *FASEB J.* 2006. **20**: 1074–1081.
 - 22 Linkermann, A., Qian, J., Lettau, M., Kabelitz, D. and Janssen, O., Considering Fas ligand as a target for therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets* 2005. **9**: 119–134.
 - 23 Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D. R., Lee, P. P. et al., Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8 T cell development. *Nat. Immunol.* 2001. **2**: 235–241.
 - 24 Echtenacher, B., Falk, W., Männel, D. N. and Krammer, P. H., Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J. Immunol.* 1990. **145**: 3762–3766.
 - 25 Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okamura, H. et al., Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J. Immunol.* 1999. **163**: 1906–1913.
 - 26 Shen, H., Boyer, M. and Cheng, T., Flow cytometry-based cell cycle measurement of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Methods Mol. Biol.* 2008. **430**: 77–86.
- Abbreviations:** 7AAD: 7-amino-actinomycin · AIF: apoptosis-inducing factor · B6: C57BL/6 · FADD: Fas-associated death domain · FADD-DN: dominant negative mutant of FADD · fp.: footpad · hBcl-2: human Bcl-2 · LT: Escherichia coli heat-labile enterotoxin · PARP: poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase
- Full correspondence:** Dr. Jesús Merino, Laboratorio de Inmunología, Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain
Fax: +34-942-201945
e-mail: merinoj@unican.es
- Additional correspondence:** Dr. Ramón Merino, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Cantabria-IDICAN, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain
e-mail: merinor@unican.es
- Received: 14/10/2008
Accepted: 12/11/2008

Th17 development and autoimmune arthritis in the absence of reactive oxygen species

Annie George-Chandy, Inger Nordström, Erik Nygren,
Ing-Marie Jonsson, Jorge Postigo, Laurence Vincent Collins and
Kristina Eriksson

Department of Rheumatology and Inflammation Research, Division of Medicine,
Göteborg University, Göteborg, Sweden

Dendritic cells (DC) express a functional NADPH oxidase and produce reactive oxygen species (ROS) upon interaction with microbes and T cells. Exposure to ROS leads to DC activation and maturation, as evidenced by phenotypic and functional changes. We have evaluated how endogenous ROS production affects the cytokine secretion pattern and T cell-activating capacity of bone marrow-derived murine DC. DC treated with ROS scavengers, as well as DC from mice that lack a functional NADPH oxidase (and thereby inherently deficient in ROS production) produced significantly increased levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and TGF- β in response to microbial activation. DC deficient in ROS production induced high levels of IFN- γ and IL-17 in responding T cells after Ag-specific or superantigen-induced activation. Finally, we show that ROS deficiency affected the induction of a T cell-dependent inflammatory condition, collagen-induced arthritis (CIA). C57BL/6 mice that lack a functional NADPH oxidase developed a severe and erosive CD4-dependent CIA, whereas the majority of the congenic wild-type animals remained healthy. These data suggest that ROS act as immunomodulators in DC-driven T cell activation and perhaps also in T cell-dependent immunopathology.

Key words: CD4⁺ T cells · Cytokines · Dendritic cells · Immune regulation · Rheumatology

Introduction

Immature myeloid DC reside in non-lymphoid organs and sense the environment through the expression of a panel of pattern-recognition receptors. In the immature stage, DC have a high capacity to ingest foreign Ag but they express low levels of molecules that are involved in T cell activation. Once activated through one or several pattern recognition receptors, the DC undergo phenotypic and functional changes that involve migration to a lymphoid organ, reduced ability to sample Ag, and enhanced expression and secretion of molecules that attract and activate naive T cells. Thus, both the localization of DC and the capacity of DC to activate T cells are maturation dependent. Depending on the nature of the activating stimuli and the signaling properties of the pattern-recognition receptors involved, the DC acquire certain

traits that affect the quality of the ensuing T cell response. The best known example is the development of Th1 and Th2 responses, which depend to a large extent on the cytokine secretion profile induced in the DC (reviewed in [1]). Consequently, factors that affect the maturation of DC influence the subsequent T cell profile.

ROS represent endogenous factors that may influence the function of DC. ROS induce both DC maturation [2, 3] and the synthesis of pro-inflammatory cytokines [4]. Conversely, anti-oxidants block DC maturation [5]. DC have all the components of a functional NADPH oxidase within their plasma membranes [6], and produce ROS in response to both cognate T cell interactions [7] and microbial components [8, 9]. Thus, ROS could serve as endocrine regulators of DC function and thereby influence the nature of the ensuing immune response. There is evidence that ROS change the outcome of the DC-T cell interaction. Even though ROS-deficient DC have retained the capacity to induce T cell proliferation *in vitro* [9], T cells activated in the absence of ROS exhibit an altered differentiation profile and are skewed towards a

Correspondence: Kristina Eriksson
e-mail: kristina.eriksson@microbio.gu.se

Th1-biased response [10]. Data from *in vivo* studies support the notion of altered T cell activity in the absence of ROS [11]. However, whether this reflects an altered function of the DC or a direct effect of ROS on the developing T cell remains to be determined.

In the present study, we have investigated the extent to which endogenous ROS affect the production of pro-inflammatory cytokines by DC as well as the effects of ROS on DC-driven T cell maturation. The functional consequences of ROS deprivation were also analyzed in a murine model of T cell-dependent inflammation, the collagen-induced arthritis (CIA) model. In this murine model of rheumatoid arthritis, collagen type II (CII) injected subcutaneously together with adjuvant promotes the induction of joint inflammation and destruction in a process that involves both T cells and B cells. We show that endogenous ROS are immunomodulatory, in that they reduce the synthesis of pro-inflammatory cytokines and TGF- β and subsequent Th17 and Th1 development *in vitro* as well as suppressing T cell-driven autoimmune immunopathology *in vivo*.

Results

DC produce enhanced levels of proinflammatory cytokines in the absence of ROS

First, we evaluated whether endogenous ROS production affects the inflammatory responses of DC. Bone marrow-derived DC were activated for 24 h with killed *Staphylococcus aureus* in the absence or presence of ROS scavengers and the supernatants were analyzed for cytokine content. BALB/c mouse-derived DC produced elevated levels of both IL-1 (Fig. 1A) and TNF- α (Fig. 1B) when incubated together with the ROS scavengers superoxide dismutase (SOD) and catalase. To confirm that these responses were a direct consequence of ROS deprivation, we also compared the cytokine responses of DC obtained from mice lacking a functional NADPH oxidase, *i.e.*, mice with chronic granulomatous disease (CGD), to those of the WT control (C57BL/6). The DC from CGD mice produced significantly higher levels of these cytokines compared to the DC from WT mice after exposure to killed *Mycobacterium tuberculosis* (Fig. 1C, D). Therefore, we conclude that ROS deficiency amplifies the production of pro-inflammatory cytokines by DC.

CGD DC induce enhanced IFN- γ responses in responding T cells

To assess whether ROS production from DC affects T cell responses, purified CD4⁺ T cells from OT-II mice, WT mice or CGD mice were incubated with DC from either WT or CGD mice together with OVA peptide (OT-II T cells), staphylococcal enterotoxin B (SEB) or toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) (WT and CGD T cells) and the IFN- γ responses in the culture supernatants were measured. CGD DC that presented the OVA

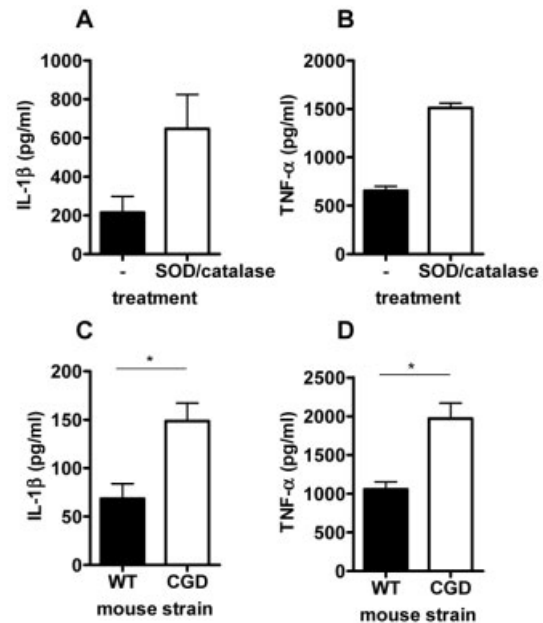


Figure 1. DC produce enhanced levels of proinflammatory cytokines in the absence of ROS. DC from BALB/c mice were activated with killed *S. aureus* in the presence or absence of the ROS scavengers SOD and catalase and the levels of IL-1 β (A) and TNF- α (B) were measured in 24-h culture supernatants. DC from CGD or WT mice were activated with killed *M. tuberculosis* and the levels of IL-1 β (C) and TNF- α (D) in the 24-h culture supernatants were assayed by ELISA. * $p < 0.05$ using Student's *t*-test. Due to the variations in the overall magnitude of the cytokine responses between individual experiments, $n = 3$ –6 from one representative experiment out of two to three experiments.

peptide induced higher production of IFN- γ from OT-II T cells than did WT DC (Fig. 2A). Similarly, when the DC were mixed with WT T cells (Fig. 2B) or CGD T cells (Fig. 2C, D) together with superantigen, the levels of IFN- γ in the culture supernatants were significantly higher for the CGD DC than for the WT DC. The levels of IFN- γ produced were not affected by the NADPH oxidase status of the responding T cells, since the level of IFN- γ secretion did not differ between TSST-1-activated responding CGD T cells (Fig. 2B) and WT T cells (Fig. 2D). Therefore, we conclude that ROS secreted from DC but not from T cells affect IFN- γ production by T cells in response to a specific Ag and superantigens.

To delineate the mechanism whereby CGD DC enhances the IFN- γ production from responding T cells, we investigated (i) if ROS deficiency affected the DC viability and maturation, and (ii) if TNF- α was required for the enhanced IFN- γ responses. We found that activated CGD DC were less mature than WT DC. Fewer of the CGD DC expressed the maturation marker CD83 and the co-stimulatory molecule CD86 (Fig. 3A). We conclude that the enhanced capacity of CGD DC to induce Th1 cytokine production was not due to an enhanced phenotypic activation status of these DC. CGD DC were, however, significantly less prone to become apoptotic/necrotic following bacterial activation compared to WT DC (Fig. 3B). In essence, this means that CGD DC cultures will contain higher numbers of viable cells compared to a WT DC

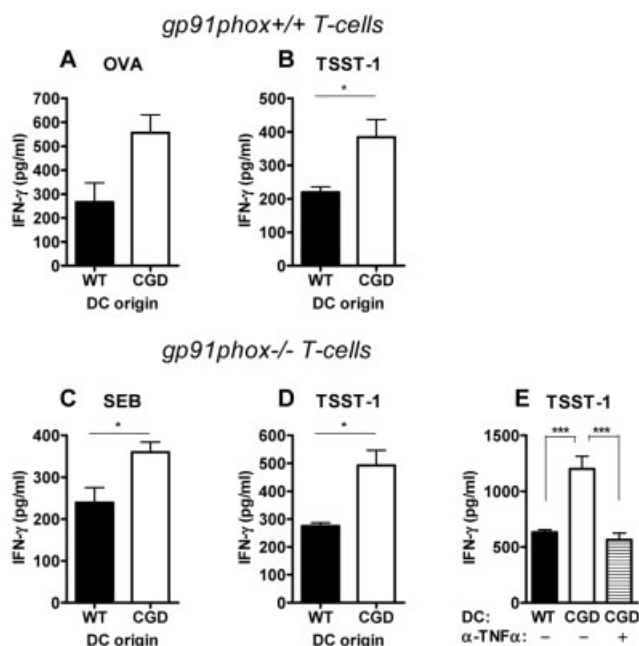


Figure 2. CGD DC enhance Ag-specific and superantigen-induced IFN- γ responses in both WT and CGD T cells. DC from WT or CGD mice were incubated with OT-II cells and OVA peptide (A), WT T cells and TSST-1 (B), CGD T cells and SEB (C), CGD T cells and TSST-1 (D), or CGD T cells and TSST-1 in the presence of either Enbrel[®], a TNF- α blocker, or human IgG as control (E), and the levels of IFN- γ in the supernatants were assayed by ELISA after 48 h. * $p < 0.05$ using Student's t-test (A–D) and *** $p < 0.001$ using ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test (E). Due to the variations in the overall magnitude of the cytokine responses between individual experiments, $n = 3$ –8 from one representative experiment out of two to three experiments (except experiment E which was only performed once, with $n = 5$).

culture, which might explain their higher production of TNF- α and IL-1 β . Finally, we show that TNF- α was required for the elevated production of IFN- γ by TSST-1-activated T cells. Addition of Enbrel[®], a TNF- α blocker, to DC-T cell cultures normalized the IFN- γ responses obtained using CGD DC as APC to the levels induced using WT DC as APC (Fig. 2E). Thus, we conclude that

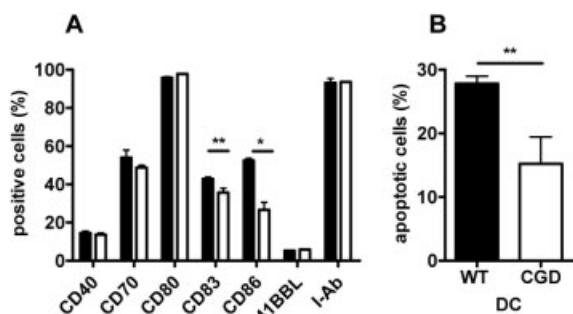


Figure 3. Phenotypic analysis of DC. CGD (open bars) and WT (closed bars) DC were activated for 24 h with *M. tuberculosis* and then analyzed by flow cytometry for cell surface phenotype (A) and apoptosis (B). ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ using Student's t-test; $n = 3$ –8 from two separate experiments.

ROS deficiency promotes DC survival and thus DC cytokine secretion, which in its turn affects the subsequent T cell responses.

NADPH oxidase deficiency promotes the induction of CIA in C57BL/6 mice

To assess the functional consequences of ROS deficiency on T cell-dependent inflammation, we choose the collagen-induced model of murine arthritis (CIA). Although C57BL/6 mice are normally resistant to CIA, they can be induced to develop this disease using an immunization procedure that has been modified for optimal responses in DBA/1 mice [12]. Using this modified protocol, we induced arthritis in a minority of the C57BL/6 mice (Fig. 4). In contrast, the majority of the CGD mice developed arthritis following two injections of CII/CFA. The arthritis in the CGD mice was evident both clinically (Fig. 4A) and histologically (Fig. 4B, C) and involved both synovitis and destruction of cartilage and bone; the disease was quite severe in many of the affected animals.

To ensure that the CIA observed in CGD mice was indeed mediated by T cells, we performed two control experiments. First, the arthritis induced in CGD mice was Ag specific, since none of the four CGD mice given CFA alone (without CII) developed arthritis, while three of the four CGD mice given CII/CFA developed arthritis (not shown). Second, arthritis development in CGD mice was CD4⁺ T cell dependent, since all the mice depleted

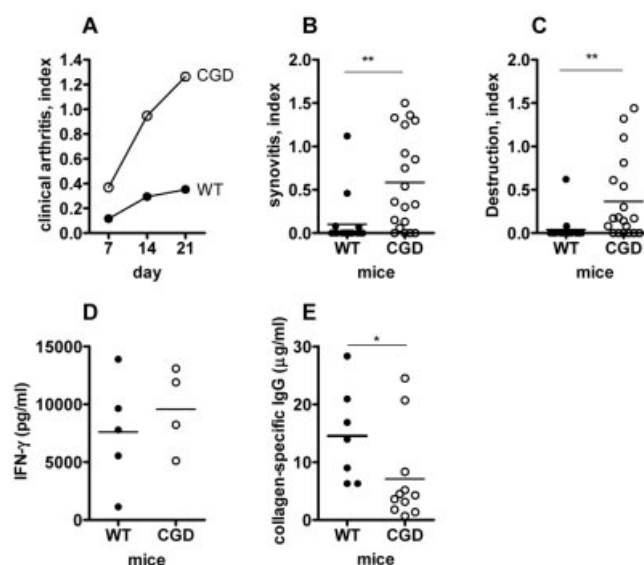


Figure 4. NADPH oxidase deficiency promotes the induction of CIA in C57BL/6 mice. WT and CGD mice received two injections, 3 weeks apart, of collagen/CFA. The mice were examined once weekly for 3 weeks for external/clinical signs of arthritis (A). After 3 weeks, the animals were killed and the joints were examined histologically for synovitis (B) and joint destruction (C). LN cells obtained from CII/CFA immunized mice were activated for 48 h with denatured collagen and the supernatants were then analyzed for IFN- γ content (D). Sera from WT and CGD mice were obtained 3 weeks after the second collagen/CFA injection and the levels of anti-collagen IgG were determined by ELISA (E). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ using Student's t-test. (A–C) $n = 17$ –19 from three separate experiments; (D) $n = 5$ and (E) $n = 7$ –11 from one experiment each.

in vivo of CD4⁺ T cells were completely protected from arthritis development (not shown).

Characterization of the immune responses in CII-immunized CGD mice

Since T cells were required for the induction of CIA, we assessed the T cell responses to CII in mice given CII/FCA. LN suspensions from both WT and CGD mice produced IFN- γ in response to CII (Fig. 4D). There was no statistical difference in the amount of IFN- γ produced from the same number of WT and CGD LN cells. However, when we excised the inguinal LN from WT and CGD mice, we observed that the LN from CGD mice were significantly larger (Fig. 5A) and contained significantly higher numbers of B cells and T cells (Fig. 5B–D) compared to the LN from WT mice. Thus, on a LN basis, the total amount of IFN- γ produced in response to CII was higher in LN from vaccinated CGD compared to vaccinated WT animals.

CIA in C57BL/6 mice has been shown to rely not only on CD4⁺ T cells but also on B cells [12]. Therefore, we analyzed the levels of CII-specific IgG Ab in sera obtained from WT and CGD mice 3 weeks after the second CII/CFA injection. We found that CGD mice had significantly lower serum levels of CII-specific IgG compared to WT mice (Fig. 4E), which indicates that CIA occurs at a higher frequency in CGD mice (compared to WT mice) despite their reduced Ab responsiveness to CII.

Th17 development in the absence of ROS

T cells secreting IL-17, so-called Th17 cells, have recently been ascribed a central role in the development of several autoimmune conditions [13, 14] including arthritis [15]. Given the higher incidence and severity of CIA in CGD compared to WT C57BL/6 mice, we assessed to what extent ROS deficiency would affect the secretion of cytokines that induce (IL-6 and TGF- β) and maintain (IL-23) IL-17-producing T cells [13], as well as the IL-17 secretion by T cells. We found that CGD DC activated by *M. tuberculosis* produced significantly higher levels of TGF- β (Fig. 6A) and IL-6 (Fig. 6B) compared to WT DC. No measurable levels of IL-23 were secreted by either DC subset following activation by *M. tuberculosis* (not shown). Finally, TSST-1-activated T cells produced significantly higher levels of IL-17 when CGD rather than WT DC were used as APC (Fig. 6C), without affecting the frequency of FOXP3-expressing regulatory T cells in these cultures (Fig. 6D).

Discussion

In the present study, we show that DC that are activated *in vitro* in the absence of ROS secrete higher levels of both pro-inflammatory (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) and anti-inflammatory (TGF- β) cytokines upon activation and enhance the secretion of IL-17 and IFN- γ from responding T cells. *In vivo*, we show that ROS deficiency predisposes the animal to T cell-mediated inflammation, which

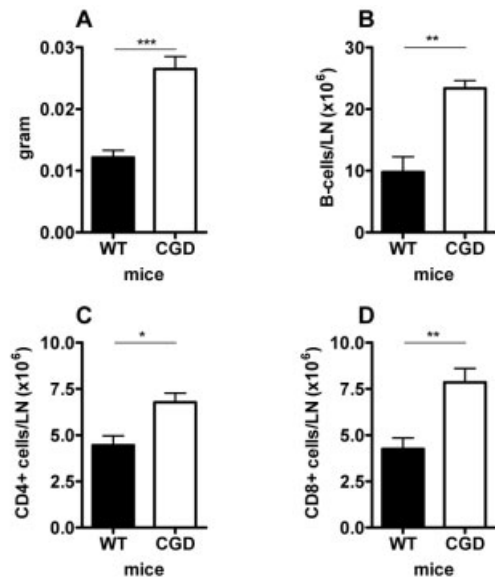


Figure 5. CIA in CGD mice is associated with an accelerated lymphocyte expansion. Draining LN were excised from WT and CGD mice 17 days after a single collagen/CFA injection. The LN weights (A) were recorded as well as the total numbers of B cells (B), CD4⁺ T cells (C) and CD8⁺ T cells (D). **p*<0.05, ***p*<0.01 and ****p*<0.001 using Student's *t*-test; *n*=5 from one experiment.

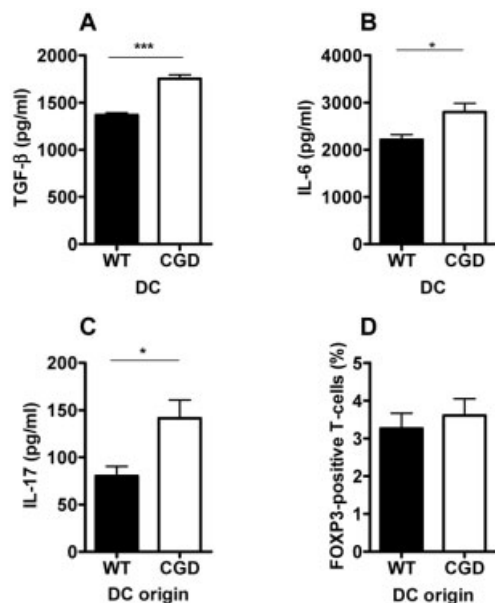


Figure 6. CGD DC produce enhanced levels of both TGF- β and IL-6 and promote IL-17 production in responding T cells. DC from CGD or WT mice were activated with killed *M. tuberculosis* and the levels of TGF- β (A) and IL-6 (B) in the 24-h culture supernatants were assayed by ELISA. DC from WT or CGD mice were incubated with CGD T cells and TSST-1. The levels of IL-17 in 48-h supernatants were assayed by ELISA (C). The frequency of FOXP3-expressing T cells was determined by flow cytometry (D). ****p*<0.001 and **p*<0.05 using Student's *t*-test; *n*=8–10 from at least two sets of experiments.

is associated with an enhanced lymphocyte expansion but diminished Ab responses to the specific Ag. These studies suggest that ROS have immunomodulatory functions that affect DC-T cell-driven inflammatory conditions.

DC are the main APC in the body and as such control the fate of the specific immune response. By virtue of their activation status they control not only if immune activation will occur, but also the functional characteristics of such a response. DC can thus initiate most (if not all) T cell-driven responses, including those causing autoimmune diseases such as arthritis [16].

DC that were activated in the presence of ROS scavengers and DC from NADPH oxidase-deficient (CGD) mice produced higher levels of IL-1, IL-6 and TNF- α *in vitro* than DC activated in the absence of ROS scavengers and DC from the corresponding WT mice, respectively. The elevated levels of these pro-inflammatory cytokines was linked to, and probably a consequence of, the reduced rate of activation-induced DC apoptosis which occurred in CGD DC. These data fit well with the results of a recent study showing that mononuclear cell suspensions from CGD patients as well as crude spleen cell suspensions from CGD mice produce enhanced levels of inflammatory cytokines in response to various microbial products [17].

One novel and important finding was that ROS deficiency promoted the development of Th17 cells, *i.e.*, T cells that secrete IL-17. Th17 cells are implicated in many autoimmune diseases including arthritis [13–15]. CGD DC produced increased levels of TGF- β and IL-6, the two main cytokines that promote the formation of IL-17-producing T cells [18]. Logically, we found that T cells activated by CGD DC produced enhanced levels of IL-17. The increased TGF- β production by CGD DC did, however, not affect the ratio of FOXP3-expressing regulatory T cells. Since IL-6 efficiently blocks TGF- β -induced regulatory T cell induction [19], we believe that the high levels of IL-6 produced by CGD DC might explain the containment of the regulatory T cell pool.

It has previously been shown that the lack of a functional NADPH oxidase leads to Th1 development in murine LN and spleen cell suspensions [10]. We show that the enhanced Th1 induction is induced by NADPH oxidase-deficient DC, and that the increased IFN- γ production induced by these DC occurs independently of the ability of the T cells to produce ROS. Thus, a change in the behavior of the ROS-deficient DC, rather than a change in the responsiveness of ROS-deficient T cells, accounts for the observed amplification of Th1 responses. The fact that the inherent capacity of T cells to produce ROS did not impact on their Ag-specific or superantigen-induced IFN- γ -secretion may also reflect the ability of the T cells to produce ROS independently of NADPH oxidase [10, 20]. The enhanced production of IFN- γ correlates with the amplified production of IL-1 β and TNF- α by the ROS-deficient DC, and TNF- α blockage normalized these IFN- γ responses. The latter cytokines have strong inflammatory properties and also promote acquired immune responses, including Th1 immunity, perhaps as a consequence of their ability to up-regulate the transcription of genes that encode inflammatory T cell cytokines, such as IFN- γ [21–23]. The enhanced IFN- γ production may result from direct activation of AP-1 and NF- κ B by IL-1 and TNF- α , leading to

transcription of the IFN- γ gene [24]. Overproduction of IL-1 and TNF- α may also account for the hyperactivation observed in CGD mice given CII/CFA, with enlargement of the draining LN.

The simultaneous induction of IFN- γ and IL-17 in T cells that were activated in the presence of CGD DC is in line with recent data showing that both these cytokines can be induced by IL-6 and TGF- β [19]. Furthermore, *in vivo* and *in vitro* studies show that IFN- γ and IL-17 can be expressed by the same T cell, in particular if the T cell has been activated by TNF- α -treated DC [25, 26]. Thus, the dual Th1/Th17 induction by CGD DC might represent a natural first step in the T cell differentiation pathway in situations when not only IL-6 and TGF- β levels are high, but also TNF- α is present.

Genetic deletion of gp91phox, which abrogates NADPH oxidase function and ROS production, significantly enhanced both the incidence and the severity of CII in C57BL/6 mice. The induced CIA was both Ag (CII) specific and required the presence of CD4⁺ T cells. That reduced levels of ROS, or ROS deficiency, amplify arthritis in genetically susceptible mouse and rat strains has been elegantly shown by Rikard Holmdahl and collaborators [11, 27, 28]. However, this is the first study to show that ROS deficiency alone predisposes for CIA, and also the first study to link ROS deficiency with enhanced Th17 responses. These findings corroborate clinical studies showing an association between autoimmune phenomena, including arthritis, and CGD [29, 30].

In the absence of ROS, DC appear to promote the development of autoreactive T cells. Reduced levels of ROS due to mutations in genes that encode the NADPH oxidase subunits enhance the level of T cell-dependent arthritis [11, 27, 28], and adoptive transfer studies point to enhanced aggressiveness of the autoreactive T cells [11]. This has been further substantiated by a study showing that Ag-specific T cell proliferation and cytokine production can be modulated by treating the APC with an antioxidant [7].

We and others have shown that ROS protect against arthritis in rodents. However, the component(s) of the ROS cascade that mediates this effect remains unknown. O₂⁻ is not a likely candidate, as O₂⁻ appears to enhance rather than protect against arthritis. Mice that lack endogenous SOD, and which are thereby inherently impaired in their ability to reduce O₂⁻, have a more aggressive course of experimental T cell-dependent arthritis [31], whereas scavenging of O₂⁻ (by SOD) *in vivo* suppresses both the induction and the course of experimental arthritis [32–34].

IL-1, TNF- α , IFN- γ and IL-17 are all implicated in rheumatoid arthritis. All four cytokines are expressed in rheumatoid synovial tissue [35, 36]. Th17 cells are required for CIA development as they play a crucial role in the inductive phase of disease development [37], and anti-IL-17 treatments thus suppress the development of CIA [38, 39]. IL-1 and TNF- α production by APC can induce IFN- γ production by CD4⁺ T cells, and these CD4⁺ T cells then promote arthritis induction by enhancing autoantigen presentation and stimulating local synovial production of IL-1 and TNF- α by resident macrophages [40]. The IL-1 and TNF- α produced locally in the joint have pivotal roles in arthritis development, accounting for cartilage and bone destruction, and neutralization of either of these cytokines markedly improves the course of the disease [35, 40].

Consequently, drugs that promote ROS production *in vivo* have beneficial effects on arthritis development in mice [41].

CGD mice developed significantly lower levels of CII-specific IgG during CIA compared to WT mice, despite the higher incidence of arthritis in the CGD animals. Thus, the levels of collagen-specific Ab obtained in CGD mice were sufficient for CIA to develop. The abrogated Ab response in CGD mice is most likely due to the beneficial effects of ROS on B cell signaling. In the presence of ROS (or more specifically H_2O_2), the dose response of Ag-specific activation of B lymphocytes is shifted to a lower Ag concentration. This is mainly due to the oxidation of negative regulatory enzymes in B cells that control the signaling from the B cell receptor [42].

In summary, we show that an abrogated NADPH oxidase function in DC enhances their capacity to produce pro-inflammatory cytokines as well as TGF- β and to induce both Th17 and Th1 responses *in vitro*. T cell development was further shown to rely exclusively on the NADPH oxidase status of the activating DC, irrespective of the ROS-producing capacity of the responding T cell. *In vivo*, deletion of the NADPH oxidase promoted the induction of CD4-mediated inflammation, namely CIA.

Materials and methods

Mice

Male 6–8-week-old mice were used for all the experiments. C57BL/6 mice and BALB/c mice were purchased from B&K Universal AB (Stockholm, Sweden). C57BL/6 mice that express a transgenic α/β TCR specific for peptide 323–339 of OVA (OT-II mice) [43] were a kind gift from Dr Mary-Jo Wick, University of Göteborg, Sweden. Mice that lack the 91-kDa subunit of oxidase cytochrome B (gp91phox [44]) (CGD mice) and that had been back-crossed for 12 generations onto the C57BL/6 background were purchased from JAX mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and were bred at the Department of Rheumatology and Inflammation Research, Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Sweden. The studies were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation, Göteborg, Sweden.

Generation of mouse myeloid DC

DC were generated as described previously [45]. Briefly, bone marrow precursors were obtained by flushing the marrow from the femur and tibia and depleted of erythrocytes with ammonium chloride. T cells, B cells, and MHC class II-positive cells were removed by incubation with rat anti-mouse-CD4, anti-CD8, anti-B220, and anti-I-A^d Ab (5 μ g/mL of each; all from Pharmingen, San Diego, CA), followed by incubation with sheep anti-rat IgG and sheep anti-mouse IgG magnetic beads (DYNAL, Oslo) and separation using a magnet. The remaining cells were resuspended in Iscove's medium that was supplemented with 10% FCS and 4 ng/mL recombinant murine GM-CSF (Pharmingen) and plated

at 1×10^6 cells/mL in 24-well plates. Half of the medium was replaced every second day. On day 6, nonadherent DC were harvested and further purified by density centrifugation on 18% metrizamide (Sigma) dissolved in 2% FCS-PBS at $700 \times g$.

Cytokine secretion by DC

DC were incubated at 10^5 cells/well in flat-bottom 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in the presence or absence of 10 μ g/mL killed and dried *M. tuberculosis* H37 Ra (Difco, Detroit, MI), 10^8 CFU/mL *S. aureus*, 50 U/mL SOD (a scavenger of O_2^-) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 2000 U/mL catalase (a scavenger of H_2O_2) (Boehringer Mannheim) in 200 μ L complete medium. Culture supernatants were collected at 24 h and frozen at -70°C until assayed for cytokine content. Culture supernatants were analyzed for IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-23 and TGF- β using specific DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

Cytokine secretion by T cells

T cells were purified from peripheral LN or spleens using T cell purification columns (R&D Systems). DC from C57BL/6 mice or CGD mice were plated at 10^4 cells/well in flat-bottom 96-well plates (Nunc) together with 10^5 T cells from OT-II mice, C57BL/6 mice or CGD mice and 0.1 μ g/mL OVA peptide 323–339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) (Neosystem, Strasbourg, France), 8 μ g/mL SEB (Toxin Technology Inc., Sarasota, FL) or 4 μ g/mL TSST-1 (Toxin Technology). Culture supernatants were collected at 48 h and frozen at -70°C . The culture supernatants were analyzed for IFN- γ and IL-17 content using DuoSet ELISA (R&D Systems). To block TNF- α , 2.5 μ g/mL Etanercept, a fusion protein of human IgG and the soluble TNF receptor (Enbrel[®], Wyeth) [46], was added at the initiation of the cultures. Purified IgG from human plasma (Calbiochem) was used as control.

FACS analysis

CGD and C57BL/6 DC were incubated for 24 h with 10 μ g/mL killed and dried *M. tuberculosis*. Cells were retrieved and analyzed for cell surface expression of MHC class II, co-stimulatory markers, and annexin I by FACS using the following reagents from BD Pharmingen; anti-mouse CD11c-allophycocyanin, CD40-PE, CD70-PE, CD80-PE, CD83-FITC, CD86-FITC, I-A^b-FITC, 41BBL-PE and the V apoptosis detection kit I.

CGD T cells were incubated with either WT DC or CGD DC in the presence of TSST-1, as described above. After 24 h, the cells were retrieved, washed, and then stained for intracellular FOXP3 using a FOXP3-staining kit (eBioscience). The frequency of FOXP3-expressing T cells was determined on gated T cells.

CIA

Chicken CII (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was dissolved at 2 mg/mL in 0.1 M acetic acid and mixed with an equal volume of Freund's incomplete adjuvant (Sigma) and 5 mg/mL killed and dried *M. tuberculosis* H37 Ra (Difco) (referred to as CFA). Mice were injected subcutaneously at the base of the tail twice (with a 3-week interval) with 0.1 mL/mouse of the CII/CFA solution. Clinical evaluation of arthritis was performed once weekly over the following 3 weeks. Arthritis was defined as visible joint erythema and/or swelling of at least one joint. The limbs were scored individually according to the following scale: 1, mild; 2, moderate; and 3, severe swelling/erythema. The arthritic index for an animal was defined as the total score for all four limbs. In one experiment, CGD mice were depleted of CD4⁺ T cells prior to and during CIA by injection of depleting Ab every 4th day, starting 1 day before the first CII/CFA injection. Depletion was accomplished by injecting i.p. 200 µg purified rat IgG2a anti-mouse CD4 mAb (clone H129.19, ATCC) in 200 µL PBS, followed 2 h later by 200 µg mouse IgG2a anti-rat IgG2a mAb (MAR18.5, ATCC), as previously described [47], which resulted in a 95% reduction in the number of CD4⁺ T cells in both the blood and LN.

Histological evaluation

Animals were killed 3 weeks after the second CII/CFA immunization. All four limbs were collected and subjected to routine fixation, decalcification, paraffin embedding, sectioning, and staining with hematoxylin and eosin. All slides were coded and evaluated (in a blinded fashion) for synovitis (presence of inflammatory cells in the synovium) and destruction of the bone and/or cartilage in each joint (fingers/toes, wrists/ankles, elbows, and knees) according to the following scale: 1, mild; 2, moderate; and 3, severe. An index was generated for each mouse in which the total score was divided by the number of joints examined. The number of slides examined per mouse ranged from 4 to 16.

LN analysis

Inguinal (draining) LN were excised from WT and CGD mice 17 days after a single injection of CII/CFA. The LN were weighed and single-cell LN suspensions were prepared and analyzed for total numbers of B cells and T cells using the following mouse-specific mAb (Pharmingen/BD): B220-allophycocyanin, CD4-FITC, and CD8-PerCp.

To measure cytokine production, cells were placed at 10⁵ cells/well in flat-bottom 96-well plates (Nunc) together with heat-denatured CII. Culture supernatants were collected at 48 h and frozen at -70°C. The culture supernatants were analyzed for IFN-γ and IL-17 content using DuoSet ELISA.

ELISA for collagen-specific Ab

Sera were collected from WT and CGD mice 3 weeks after the second injection of CII/CFA, and 96-well plates (Nunc) were coated overnight at 4°C with 10 µg/mL native chicken CII and then blocked with 0.5% BSA-PBS. Standard serum (kind gift from professor Rikard Holmdahl, Lund University, Sweden) and samples were diluted in 0.5% BSA-PBS. Biotinylated F(ab')₂ fragments of goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) were used as the secondary Ab. Development was performed using 0.5 µg/mL horseradish peroxidase followed by 2.5 mg/mL of the enzyme substrate ABTS (Sigma) in citrate buffer (pH 4.2) that contained 0.025% H₂O₂. The absorbance was measured at 405 nm in a SPECTRAmax spectrophotometer.

Statistics

Statistical analyses were carried out with the Student's two-tailed *t*-test or ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test using the GraphPad PRISM software.

Acknowledgements: These studies were supported by the Swedish Science Council (research position for K.E.), King Gustaf V 80-Year Foundation (K.E. and L.V.C.), the Nanna Svartz Foundation (L.V.C.), Swedish Rheumatism Association (L.V.C.), Göteborgs Reumatikerförbund (K.E. and L.V.C.), Torsten and Ragnar Söderbergs stiftelser (K.E.), and Västra Götalandsregionen through LUA/ALF (L.V.C.).

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Palucka, K. and Banchereau, J., How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 2002. **14**: 420–431.
- 2 Rutault, K., Alderman, C., Chain, B. M. and Katz, D. R., Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 1999. **26**: 232–238.
- 3 Kantengwa, S., Jornot, L., Devenoges, C. and Nicod, L. P., Superoxide anions induce the maturation of human dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003. **167**: 431–437.
- 4 Verhasselt, V., Goldman, M. and Willems, F., Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-α synthesis by human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1998. **28**: 3886–3890.
- 5 Tan, P. H., Sagoo, P., Chan, C., Yates, J. B., Campbell, J., Beutelspacher, S. C., Foxwell, B. M. et al., Inhibition of NF-κappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *J. Immunol.* 2005. **174**: 7633–7644.

- 6 Elsen, S., Doussiere, J., Villiers, C. L., Faure, M., Berthier, R., Papaioannou, A., Grandvaux, N. *et al.*, Cryptic O₂⁻-generating NADPH oxidase in dendritic cells. *J. Cell Sci.* 2004. **117**: 2215–2226.
- 7 Matsue, H., Edelbaum, D., Shalhevet, D., Mizumoto, N., Yang, C., Mummert, M. E., Oeda, J. *et al.*, Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J. Immunol.* 2003. **171**: 3010–3018.
- 8 Werling, D., Hope, J. C., Howard, C. J. and Jungi, T. W., Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 2004. **111**: 41–52.
- 9 Vulcano, M., Dusi, S., Lissandrini, D., Badolato, R., Mazzi, P., Riboldi, E., Borroni, E. *et al.*, Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. *J. Immunol.* 2004. **173**: 5749–5756.
- 10 Jackson, S. H., Devadas, S., Kwon, J., Pinto, L. A. and Williams, M. S., T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat. Immunol.* 2004. **5**: 818–827.
- 11 Olofsson, P., Holmberg, J., Tordsson, J., Lu, S., Akerstrom, B. and Holmdahl, R., Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat. Genet.* 2003. **33**: 25–32.
- 12 Campbell, I. K., Hamilton, J. A. and Wicks, I. P., Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: New insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 2000. **30**: 1568–1575.
- 13 Stockinger, B. and Veldhoen, M., Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2007. **19**: 281–286.
- 14 Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V. K., T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 2007. **8**: 345–350.
- 15 Brennan, F. and Beech, J., Update on cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2007. **19**: 296–301.
- 16 Leung, B. P., Conacher, M., Hunter, D., McInnes, I. B., Liew, F. Y. and Brewer, J. M., A novel dendritic cell-induced model of erosive inflammatory arthritis: Distinct roles for dendritic cells in T cell activation and induction of local inflammation. *J. Immunol.* 2002. **169**: 7071–7077.
- 17 Bylund, J., MacDonald, K. L., Brown, K. L., Mydel, P., Collins, L. V., Hancock, R. E. W. and Speert, D. P., Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leucocytes involve ROS-independent activation of NF-kappaB. *Eur. J. Immunol.* 2007. **37**: 1087–1096.
- 18 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. and Stockinger, B., TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports *de novo* differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006. **24**: 179–189.
- 19 Kimura, A., Naka, T. and Kishimoto, T., IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007. **104**: 12099–12104.
- 20 Devadas, S., Zaritskaya, L., Rhee, S. G., Oberley, L. and Williams, M. S., Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: Selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J. Exp. Med.* 2002. **195**: 59–70.
- 21 Nimal, S., Heath, A. W. and Thomas, M. S., Enhancement of immune responses to an HIV gp120 DNA vaccine by fusion to TNF alpha cDNA. *Vaccine* 2006. **24**: 3298–3308.
- 22 Boraschi, D. and Tagliabue, A., Interleukin-1 and interleukin-1 fragments as vaccine adjuvants. *Methods* 1999. **19**: 108–113.
- 23 Staats, H. F. and Ennis, F. A. Jr., IL-1 is an effective adjuvant for mucosal and systemic immune responses when coadministered with protein immunogens. *J. Immunol.* 1999. **162**: 6141–6147.
- 24 Gloire, G., Legrand-Poels, S. and Piette, J., NF-kappaB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 2006. **72**: 1493–1505.
- 25 Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E. *et al.*, Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 2007. **204**: 1849–1861.
- 26 Iwamoto, S., Iwai, S., Tsujiyama, K., Kurahashi, C., Takeshita, K., Naoe, M., Masunaga, A. *et al.*, TNF-alpha drives human CD14⁺ monocytes to differentiate into CD70⁺ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J. Immunol.* 2007. **179**: 1449–1457.
- 27 Hultqvist, M., Olofsson, P., Holmberg, J., Backstrom, B. T., Tordsson, J. and Holmdahl, R., Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004. **101**: 12646–12651.
- 28 Hultqvist, M. and Holmdahl, R., Ncf1 (p47phox) polymorphism determines oxidative burst and the severity of arthritis in rats and mice. *Cell. Immunol.* 2005. **233**: 97–101.
- 29 Lee, B. W. and Yap, H. K., Polyarthritis resembling juvenile rheumatoid arthritis in a girl with chronic granulomatous disease. *Arthritis Rheum.* 1994. **37**: 773–776.
- 30 Manzi, S., Urbach, A. H., McCune, A. B., Altman, H. A., Kaplan, S. S., Medsger, T. A. Jr. and Ramsey-Goldman, R., Systemic lupus erythematosus in a boy with chronic granulomatous disease: case report and review of the literature. *Arthritis Rheum.* 1991. **34**: 101–105.
- 31 Ross, A. D., Banda, N. K., Muggli, M. and Arend, W. P., Enhancement of collagen-induced arthritis in mice genetically deficient in extracellular superoxide dismutase. *Arthritis Rheum.* 2004. **50**: 3702–3711.
- 32 Dai, L., Claxson, A., Marklund, S. L., Feakins, R., Yousaf, N., Chernajovsky, Y. and Winyard, P. G., Amelioration of antigen-induced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes. *Gene Ther.* 2003. **10**: 550–558.
- 33 Iyama, S., Okamoto, T., Sato, T., Yamauchi, N., Sato, Y., Sasaki, K., Takahashi, M. *et al.*, Treatment of murine collagen-induced arthritis by *ex vivo* extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Arthritis Rheum.* 2001. **44**: 2160–2167.
- 34 Salvemini, D., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., De Sarro, A., Caputi, A. P. and Cuzzocrea, S., Amelioration of joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *Arthritis Rheum.* 2001. **44**: 2909–2921.
- 35 Andreaskos, E. T., Foxwell, B. M., Brennan, F. M., Maini, R. N. and Feldmann, M., Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: Present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002. **13**: 299–313.
- 36 Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S. *et al.*, IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 1999. **103**: 1345–1352.
- 37 Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. and Iwakura, Y., Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J. Immunol.* 2003. **171**: 6173–6177.
- 38 Lubberts, E., Koenders, M. I., Oppers-Walgreen, B., van den Bersselaar, L., Coenen-de Roo, C. J., Joosten, L. A. and van den Berg, W. B., Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 2004. **50**: 650–659.
- 39 Rohn, T. A., Jennings, G. T., Hernandez, M., Grest, P., Beck, M., Zou, Y., Kopf, M. and Bachmann, M. F., Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 2006. **36**: 2857–2867.

- 40 Choy, E. H. and Panayi, G. S., Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2001. **344**: 907–916.
- 41 Hultqvist, M., Olofsson, P., Gelderman, K. A., Holmberg, J. and Holmdahl, R., A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS Med.* 2006. **3**: e348.
- 42 Reth, M., Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* 2002. **3**: 1129–1134.
- 43 Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. and Carbone, F. R., Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell. Biol.* 1998. **76**: 34–40.
- 44 Pollock, J. D., Williams, D. A., Gifford, M. A., Li, L. L., Du, X., Fisherman, J., Orkin, S. H. et al., Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet.* 1995. **9**: 202–209.
- 45 Schön, E., Harandi, A. M., Nordström, I., Holmgren, J. and Eriksson, K., Dendritic cell vaccination protects mice against lethality caused by genital herpes virus type 2 infection. *J. Reprod. Immunol.* 2001. **50**: 87–106.
- 46 Lories, R. J., Derese, I., de Bari, C. and Luyten, F. P., Evidence for uncoupling of inflammation and joint remodeling in a mouse model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007. **56**: 489–497.
- 47 Goldschmidt, T. J., Holmdahl, R. and Klareskog, L., Depletion of murine T cells by *in vivo* monoclonal antibody treatment is enhanced by adding an autologous anti-rat kappa chain antibody. *J. Immunol. Methods* 1988. **111**: 219–226.

Abbreviations: CGD: chronic granulomatous disease · CIA: collagen-induced arthritis · CII: collagen type II · SEB: staphylococcal enterotoxin B · SOD: superoxide dismutase · TSST-1: toxic shock syndrome toxin-1

Full Correspondence: Kristina Eriksson, Department of Rheumatology and Inflammation Research, Guldhedsgatan 10A, 413 46 Göteborg, Sweden

Fax: +46-31-823925

e-mail: kristina.eriksson@microbio.gu.se

Current address: Erik Nygren, Department of Medical Microbiology and Immunology, Division of Biomedicine, Göteborg University, Göteborg, Sweden

Jorge Postigo, Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

Received: 2/4/07

Revised: 4/1/08

Accepted: 6/2/08

