



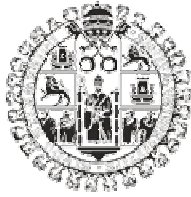
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina.

***“USO DE INHIBIDORES DE PROTEOSOMA COMO
PROFILAXIS DE ENFERMEDAD DE INJERTO
CONTRA HUESPED”***

Teresa Caballero Velázquez.

2010



Departamento de Medicina.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

D. José Antonio Pérez-Simón, Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

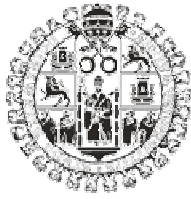
CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “USO DE INHIBIDORES DE PROTEOSOMA COMO PROFILAXIS DE ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED” realizado por la licenciada Teresa Caballero Velázquez bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Salamanca a 26 de Octubre de 2010.

Fdo. Dr. José Antonio Pérez Simón



Departamento de Medicina.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

D. Luis Ignacio Sánchez Abarca, Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca.

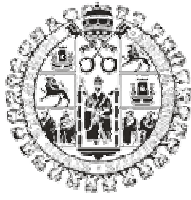
CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “USO DE INHBIDORES DE PROTEOSOMA COMO PROFILAXIS DE ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED” realizado por la licenciada Teresa Caballero Velázquez bajo su dirección en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Salamanca a 26 de Octubre de 2010.

Fdo. Dr. Luis Ignacio Sánchez-Abarca



Departamento de Medicina.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

D. Jesús Fernando San-Miguel Izquierdo, Catedrático de Hematología y Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “USO DE INHBIDORES DE PROTEOSOMA COMO PROFILAXIS DE ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUESPED” realizado por la licenciada Teresa Caballero Velázquez bajo su tutoría en el Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, reúne a su juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener el Grado de Doctor de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide la presente certificación en

Salamanca a 26 de Octubre de 2010.

Fdo. Prof. Dr. Jesús Fernando San-Miguel Izquierdo

A Jorge y nuestra familia

Agradecimientos

Debo darle mi agradecimiento a mi tutor el Profesor Jesus F. San Miguel por permitirme realizar una residencia inolvidable y la posibilidad de elaborar este trabajo en el seno de un gran equipo.

En particular deseo expresarle mi más sincero agradecimiento a mi director, el Dr. José Antonio Pérez-Simón, por brindarme una oportunidad irrepetible, confiar en mi trabajo y ensañarme con el ejemplo.

A mi director y amigo el Dr. Luis-Ignacio Sánchez-Abarca porque sin él nada hubiese sido posible.

A la Dra. M^a Consuelo del Cañizo, cuya carrera profesional y humana me inspira cada día.

A Belen Blanco por incitarme a pararme a pensar y plantearme todo desde otro punto de vista.

A Conchi por su indispensable trabajo, gran profesionalidad y siempre estar dispuesta a colaborar.

A Sandra Muntion (mi centro de información), Carmen Herrero, Soraya Carrancio, Luis Alba y Pilar Hernandez-Campo por hacerme sentir en el laboratorio como en casa. A Fermín Sánchez-Guijo por sus palabras de ánimo. Así como a Rebeca, Silvia, Miryam, Elena, Carlos, Manu, Teresa, Olga, todos grandes compañeros del laboratorio de terapia celular.

A mi amiga Lucia López-Corral por todas las cosas que hemos compartido.

A María Díez-Campelo por hacer de mi mejor médico y persona.

A Cristina Encinas (mi adjunta), Enrique Colado, Nacho Graciani y Jesús Martín, por regalarme momentos tan especiales dentro y fuera del trabajo.

A mis “profesores” de la sección de inmunopatología: Belen, Chelo y Jose por su ayuda desinteresada y ofrecerme conocer un nuevo mundo.

A Lola (que a pesar de ser Caballero no somos familia), Norma, Marivi y Lourdes que me han educado en el mundo de la hematología durante los últimos cuatro años. A Enrique Ocio por sus consejos con la rapamicina y los ratones.

A mis compañeros de fatigas e ilusiones Tomas, Jennifer, Teresa, Mónica, Jorge, Estefania, Juan, Elena, Iris y Lucia.

A Máximo e Inmaculada, mis padres, cuyas vidas son un referente para mí, por su valentía, esfuerzo e instinto de superación así como por su apoyo incondicional. A mis tres hermanos, German, Elena y Rosalia y sus respectivos, Eva y Javi, que conforman la maravillosa familia a la que pertenezco. No olvido a mis pequeños Alvaro, Emma, Julia y Adriana, que tanta alegrían me comportan. A Toño, Nieves y Nieves Magaz por acorgeme en su casa como una más.

ABREVIATURAS

7AAD: 7 acitomicina D

Akt/PKB: serine/threonine protein kinase B.

AP-1: Factor de transcripción nuclear activador de proteína 1.

ATG: timoglobulina

ATCC: American Type Culture Collection

CaN: calcineurina

CDs: células dendríticas

CD: Cluster of Differentiation (grupo de diferenciación)

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPAg: células presentadoras de antígeno

Col: colaboradores

CsA: ciclosporina A

DMSO: dimetil sulfóxido

4EBP1: factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1

eIF4E: eukaryotic translation initiation factor 4E

EICH: enfermedad de injerto contra huésped

Echa: enfermedad de injerto contra huésped aguda

EICL: efecto de injerto contra leucemia

ELISA: enzimoimmunoanálisis

FK-506: tacrólimus

FL: fluorescencia

HLA: human leukocyte antigen

IL-1: interleuquina 1

IL-2: interleuquina 2

IL-4: interleuquina 4

IL-6: interleuquina 6

IL-10: Interleuquina 10

IL-15: interleuquina 15

IFN α : interferon α

JAK: janus kinase

LPS: lipopolisacaridos

MAPK: mitogen-activated protein kinase

mHA: antígenos menores de histocompatibilidad

MMF: micofenolato mofetil

MO: médula ósea

MPA: ácido micofenólico

MTAT: microangiopatía asociada al trasplante

mTOR: mammalian Target of Rapamycin

MTX: metotrexate

NFAT: nuclear factor of activated T cell

NF-KB: nuclear factor Kappa B

NK: natural killer

PTEN: phosphatase and tensin homolog on chromosome 10

PI3K: fosfatidilinositol-3-kinasa

PIP2: fosfatidilinositol-3,4-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

IP: intra-peritoneal

iv: intravenoso

S6K: S6 Kinasa

STAT: signal transducers and Activators of Transcription

Raptor: regulatory-associated protein of mTOR

Rictor: rapamycin-insensitive companion of mTOR

TCR: receptor de célula T

TCS: complejo de la esclerosis tuberosa

TCS1: hamartina

TCS2: tuberina

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

TOR: target of rapamycin

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

Treg: linfocitos T reguladores

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTE HISTÓRICO DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS	2
1.2. DEFINICIÓN DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO	3
1.3. CONCEPTO DE ALORREACTIVIDAD	5
1.3.1. <i>Células Dendríticas</i>	7
1.3.2. <i>Linfocitos T reguladores</i>	9
1.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED	12
1.5. PRESENTACIÓN CLÍNICA	17
1.6. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA EICH	19
1.6.1. <i>Profilaxis/tratamientos que inhiben la activación de los linfocitos T</i>	19
1.6.1.1. <i>Inhibidores de calcineurina combinado con un curso corto de MTX</i>	19
1.6.1.2. <i>Mofetil micofelonato (MMF)</i>	22
1.6.1.3. <i>Sirolimus</i>	23
1.6.2. <i>Profilaxis/tratamiento de la EICH basado en la depleción T</i>	26
1.6.2.1. <i>Timoglobulina (ATG)</i>	27
1.6.2.2. <i>Alentuzumab</i>	27
1.6.3. <i>Nuevas estrategias de profilaxis y tratamiento de la EICH</i>	27
1.6.3.1. <i>Inhibidores del proteosoma</i>	27
2. HIPÓTESIS	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. EN RELACIÓN CON EL EFECTO DEL BORTEZOMIB SOBRE LOS LINFOCITOS T REGULADORES Y ALORREACTIVOS	35
3.2. EN RELACIÓN CON EL EFECTO DEL BORTEZOMIB SOBRE LA ACTIVACIÓN Y MADURACIÓN DE LAS CDS	35
3.3. EN RELACIÓN CON LA COMBINACIÓN DE BORTEZOMIB Y SIROLIMUS	35
4. MATERIAL Y METODOS	36
4.1. MATERIAL	37

4.1.1.	<i>Material biológico</i>	37
4.1.1.1.	<i>Obtención de células para cultivo</i>	37
4.1.1.2.	<i>Animales</i>	37
4.1.1.3.	<i>Líneas celulares</i>	37
4.1.2.	<i>Material no biológico (reactivos)</i>	38
4.2.	MÉTODOS	42
4.2.1.	<i>Cultivos</i>	42
4.2.2.	<i>Estudios in vitro de bortezomib y Treg</i>	42
4.2.2.1.	<i>Obtención de células T CD4+, T CD4+CD25+ y T CD4+CD25</i>	42
4.2.2.1.1	<i>Obtención de células T CD4+</i>	42
4.2.2.1.2	<i>Obtención de células T CD4+CD25+ y T CD4+CD25-</i>	43
4.2.2.2	<i>Estudios de viabilidad de linfocitos Treg tratados con bortezomib (PKH/CD25/7AAD/CD4).</i>	43
4.2.2.3	<i>Cultivos a largo plazo de linfocitos T CD4+ o CD4+CD25-</i>	45
4.2.2.3.1	<i>Estudio del inmunofenotipo (CD25/CD127/CD4/FOXP3)</i>	47
4.2.2.3.2	<i>Estudios de funcionalidad:</i>	47
4.2.2.3.2.1	<i>Estudio de proliferación linfocitaria: PKH/CD25/7-AAD/CD3</i>	48
4.2.2.3.2.2.	<i>Activación linfocitaria: PKH/IFN/CD3/CD40L</i>	49
4.2.2.4	<i>Estudio de expresión génica de FOXP3</i>	50
4.2.3.	<i>Estudios in vitro de CDs tratadas con bortezomib</i>	50
4.2.3.1.	<i>Generación de CDs</i>	50
4.2.3.1.1.	<i>Análisis inmunofenotípico de CDs tratadas con bortezomib</i>	51
4.2.3.1.2.	<i>Estudios de viabilidad de CDs tratadas con bortezomib</i>	52
4.2.3.1.3.	<i>Estudios de Western Blot</i>	52
4.2.3.1.4.	<i>Determinación de la actividad de la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa</i>	54
4.2.3.2.	<i>Cocultivo linfocitos T y CDs</i>	54
4.2.3.2.1.	<i>Estudio inmunofenotípico de los linfocitos T efectores</i>	55
4.2.3.2.2.	<i>Determinación de IL-2, IFNα e IL-10 por medio de enzoinmunoanálisis</i>	56
4.2.4	<i>Estudios in vitro e in vivo del efecto sinérgico de bortezomib y sirolimus</i>	56

4.2.4.1	<i>Estudios de activación, viabilidad y proliferación linfocitaria in vitro con bortezomib y sirolimus</i>	56
4.2.4.1.1	Estudios de activación linfocitaria a las 48 horas de cultivo (CD25/IFN- γ /CD3/CD40L).....	57
4.2.4.1.2	Estudios de viabilidad celular a las 48 horas de cultivo (CD25/Anexina-V/7-AAD/CD3).....	58
4.2.4.1.3	Estudios de proliferación y viabilidad linfocitaria a las 96 horas de cultivo. (PKH/CD25/7-AAD/CD3).....	58
4.2.4.2	<i>Estudio de citoquinas solubles.</i>	59
4.2.4.3	<i>Estudios Western Blot en Linfocitos T</i>	60
4.2.4.4	<i>Modelo murino de EICH</i>	61
4.2.4.4.1	Células empleadas en el trasplante	61
4.2.4.4.2	Fármacos	62
4.2.4.4.3	Irradiación	62
4.2.4.4.4	Trasplante	63
4.2.4.4.5	Experimentos murinos.....	63
4.2.4.4.5.1	Modelo murino de EICH en el que valoramos el efecto sinérgico de bortezomib y sirolimus.....	63
4.2.4.4.5.2	Modelo murino de EICH con el que valoramos el efecto sinérgico de CsA y sirolimus.....	65
4.2.4.4.5.3	Modelo murino de EICH para la evaluación de la respuesta inmune frente a otros antígenos	67
4.2.4.4.5.4	Modelo murino de EICH para la evaluación del efecto del injerto contra tumor 68	
4.2.4.4.6	Análisis por citometría de flujo	70
4.2.5	<i>Análisis estadístico.</i>	70
5.	RESULTADOS	71
5.1	CAPITULO UNO: BORTEZOMIB Y LOS LINFOCITOS T REGULADORES	72
5.2	CAPITULO DOS: BORTEZOMIB Y CÉLULAS DENDRÍTICAS	82
5.3	CAPITULO TRES: BORTEZOMIB Y SIROLIMUS	95
6.	DISCUSIÓN	108

7. CONCLUSIONES	116
8. BIBLIOGRAFÍA	118

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTE HISTÓRICO DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

A finales del siglo XIX CE Brown-Sequard administró médula ósea (MO) por vía oral como tratamiento de pacientes con anemia (1). En 1939 A. Rasjek y E. Osgood empleó médula ósea por vía intramedular e intravenosa para el tratamiento de pacientes con leucemia y aplasia medular, respectivamente (1,2). En 1949, en base a los estudios de LO Jacobson y colaboradores, se demostró que los ratones irradiados letalmente eran capaces de recuperar una hematopoyesis normal si se protegía el bazo, lo cual indicaba que éste formaba parte del sistema hematopoyético (3). Ya en la década de los 50, D. Thomas empleó quimioterapia y radioterapia intensiva seguida de la infusión endovenosa de médula ósea de donante como tratamiento de seis pacientes afectados de leucemia aguda (4). Solo en dos de los seis pacientes se pudo constatar injerto de médula ósea y además de forma transitoria. Ninguno sobrevivió más allá de 100 días post-trasplante. Otro intento de trasplante de MO (fallido) fue llevado a cabo por G. Mathé en víctimas de un accidente nuclear (5). Estos primeros trasplantes permitieron observar que, a pesar de que la MO era capaz de reconstituir la hematopoyesis del receptor, los pacientes fallecían por infecciones intercurrentes y por un cuadro clínico denominado entonces “enfermedad secundaria”. En la década de los 50 J. Dausset descubrió el primer antígeno leucocitario humano que, junto con el desarrollo de los métodos de tipaje en los años 60, dio lugar a una nueva era en el trasplante de MO (6,7).

En 1968 se efectuó en Minneapolis con éxito el primer trasplante de médula ósea de la era moderna en un paciente con inmunodeficiencia congénita de un donante HLA idéntico (8). A partir de este momento los progresos en este ámbito han sido constantes

y en la actualidad constituye una de las mejores opciones terapéuticas en el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas.

1.2. DEFINICIÓN DEL TRASPLANTE ALOGÉNICO

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) representa la única posibilidad de curación para numerosos pacientes con hemopatías malignas, lo que justifica el número creciente de trasplantes realizados a nivel mundial. Se basa en la sustitución de un sistema hematopoyético neoplásico, defectuoso o insuficiente por otro normal obtenido de un donante sano histocompatible. Para ello los pacientes reciben un régimen de acondicionamiento basado en la administración de quimioterapia a menudo combinada con radioterapia o depleción de linfocitos T. Esta “preparación al trasplante” está diseñada con dos finalidades: la primera, conseguir una inmunosupresión del receptor para evitar el rechazo del injerto y la segunda, erradicar el clon maligno o población celular anormal. Clásicamente se ha considerado que el acondicionamiento tenía un tercer objetivo: crear espacio en la médula ósea para que los progenitores pudieran anidar mediante un *tratamiento mieloablatoivo* (9). Sin embargo, se ha podido comprobar que un tratamiento inmunosupresor adecuado permite evitar el rechazo y favorecer el injerto de los progenitores hematopoyéticos del donante sin necesidad de administrar dosis mieloablativas de quimio o radioterapia. Los trasplantes apoyados en este principio reciben la denominación de *trasplantes con acondicionamiento de intensidad reducida o no mieloablatoivo*, y han permitido que pacientes, que por su edad o su mal estado general, no son candidatos a un acondicionamiento mieloablatoivo puedan ser sometidos a trasplante.

Tras el acondicionamiento se administran las células progenitoras capaces de reconstituir el sistema hematopoyético. Como fuente de progenitores puede emplearse:

- *Médula ósea*, obtenida mediante punciones múltiples de las crestas ilíacas bajo anestesia general (10).

- *Sangre periférica*, tras movilización de los progenitores con factor estimulante de colonias granulocíticas con o sin quimioterapia y posterior recolecta de la capa mononuclear por aféresis (11,12).

- *Cordón umbilical* que permite recoger progenitores mediante punción de la vena umbilical inmediatamente después del parto (13).

En función del tipo de donante podemos realizar la siguiente clasificación:

-Trasplante singénico: el donante es un gemelo univitelino

-Trasplante alogénico: el donante es un sujeto HLA compatible emparentado o un voluntario identificado a través del registro nacional o internacional (no emparentado)

-Trasplante autólogo: los progenitores hematopoyéticos proceden del mismo enfermo y tras su obtención son criopreservados hasta el día de la infusión; ésta tiene lugar una vez que el enfermo ha recibido un acondicionamiento mieloablativo. El fundamento de este tratamiento es administrar altas dosis de quimioterapia y “rescatar” al paciente de la toxicidad medular producida por el acondicionamiento.

En el TPH, además de los progenitores hematopoyéticos, se infunden otras células del donante como son los linfocitos T, que juegan un papel fundamental ya que contribuyen al efecto antitumoral eliminando las células neoplásicas residuales, el denominado “**efecto de injerto contra tumor**” (EICTL), y por otro lado, facilitan el implante de los progenitores del donante.

Sin embargo, estos linfocitos T también son capaces de provocar una respuesta aloinmune, que se basa en su capacidad para reconocer antígenos menores y mayores de histocompatibilidad del paciente ausentes en el donante, activándose y generando un efecto citotóxico en órganos y tejidos sanos del receptor. Es la principal complicación

del trasplante alogénico inicialmente conocida como enfermedad secundaria (14) y actualmente denominada “**Enfermedad de injerto contra huesped**” (EICH).

Tras numerosas investigaciones, no se ha podido desarrollar ningún procedimiento capaz de separar la EICH del EICL. Desafortunadamente, los protocolos actuales de profilaxis de EICH, basados en la combinación de ciclosporina A (CsA) o tacrolimus (FK-506) (inhibidores de calcineurina (CaN)) con metotrexate (MTX), permiten mantener el efecto inmune antitumoral pero no son muy eficaces a la hora de reducir la incidencia de EICH. Por otra parte, otra de las estrategias consideradas estándar o habituales, consiste en la depleción T *in vitro* o *in vivo*, la cual disminuye significativamente el riesgo de EICH a expensas de una mayor tasa de recaídas o complicaciones infecciosas durante el periodo post-trasplante.

Es por tanto fundamental, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que prevengan la EICH sin eliminar el EICL ni la respuesta inmunitaria frente a agentes infecciosos. Es decir, dirigir la respuesta inmunológica hacia la diana tumoral evitando su activación frente a las células normales del paciente.

1.3. CONCEPTO DE ALORREACTIVIDAD

El termino de alorreactividad o alorreconocimiento define el hecho de que gran parte de los linfocitos T de un individuo son capaces de reconocer las moléculas de histocompatibilidad alogénicas (15). Por tanto, también se va a producir en trasplantes de órganos sólidos o en el intercambio feto-materno.

La compatibilidad de los tejidos viene determinada por una familia de genes ubicados en el cromosoma 6 denominado complejo mayor histocompatibilidad (CMH) que conforman el sistema HLA (human leukocyte antigen). Este sistema está formado

por un gran número de proteínas de membrana extraordinariamente polimórficas.

Existen dos clases de moléculas HLA:

- HLA clase I expresadas por todas las células del organismo excepto los hematíes y el trofoblasto fetal
- HLA clase II expresadas por las células epiteliales del timo y las células presentadoras de antígenos (CPAg): las células dendríticas (CDs), monocitos-macrófagos y linfocitos B.

Para que tenga lugar una completa activación del linfocito T se requieren dos señales: una primera señal procedente de la unión del TCR con la molécula HLA de la CPAg y una segunda señal producida por la interacción de moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86 en las CPAg y CD28 en la superficie del linfocito T (Figura (fig) 1). En ausencia de esta segunda señal la respuesta del linfocito T es incompleta o anérgica (16).

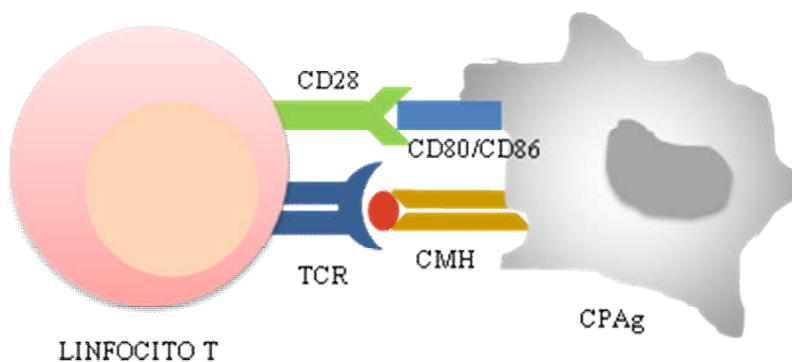


Fig 1: Presentación de antígenos de la CPAg al linfocito T.

Tanto en los TPH emparentados como en los no emparentados la incidencia de la EICH y la morbilidad post-trasplante está relacionada con la disparidad HLA. La realización del tipaje de alta resolución ha dado lugar a una mejor selección del donante lo que ha conducido a una menor incidencia de EICH grave y una mejor supervivencia. Sin embargo, a pesar de una completa identidad HLA, el desarrollo de EICH continúa siendo la principal causa de morbimortalidad, debido a que en esta situación de

identidad HLA los linfocitos T podrían reconocer los antígenos menores de histocompatibilidad (mHA) dispares entre el donante y receptor (17).

Los mHA son péptidos polimórficos derivados de proteínas intracitoplasmáticas polimórficas que pueden presentarse en la membrana celular asociados a moléculas HLA de clase I o II (18).

1.3.1. Células Dendríticas

Todas las células nucleadas del organismo expresan moléculas HLA de clase I en su superficie y, por lo tanto, pueden presentar péptidos a los linfocitos T cuando son infectadas por virus. Sin embargo, solo las CPAg son capaces de expresar moléculas HLA-II en su superficie. Se consideran CPAg a los linfocitos B, los fagocitos mononucleares y las CDs, las cuales tienen una gran capacidad de captar antígenos del medio que les rodea mediante endocitosis o fagocitosis.

Las CDs se describieron por primera vez por el científico alemán P. Langerhans a finales del siglo XIX (19). En 1973, RM Steinman y ZA Cohn acuñaron el término "célula dendrítica" para referirse a unas células con muchas ramificaciones, móviles y ricas en mitocondrias (20).

Las CDs son esenciales en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune. En situación basal, diversos mecanismos permiten desarrollar tolerancia frente a antígenos propios mediante el reconocimiento de lo propio frente a antígenos extraños al organismo. Entre estos mecanismos se describen la tolerancia central, que se produce en el timo por delección tanto de linfocitos autorreactivos como de linfocitos que no pueden reconocer el HLA propio. Los mecanismos de tolerancia central pueden no ser completamente eficaces, de manera que los linfocitos T autorreactivos escapan a esta selección negativa. Por ello, es necesaria la existencia de mecanismos periféricos de mantenimiento de la tolerancia y, a este nivel, hay dos poblaciones celulares clave: los

linfocitos T reguladores (Treg) y las células dendríticas. Éstas últimas, en situación basal, se encuentran en un estado inactivo o inmaduro, y no expresan moléculas coestimuladoras (16,21). En esta situación el contacto con los linfocitos T genera una respuesta inmunotolerante (22,23). Por el contrario, en situación de estrés o inflamación, las CDs maduran y se activan expresando moléculas coestimuladoras y dando lugar a una respuesta inmune frente al antígeno presentado (24).

Por tanto, las CDs están especializadas en captar y presentar antígenos a las células T vírgenes (25). Este proceso tiene lugar en presencia de citoquinas proinflamatorias, y es el mecanismo más importante que da lugar a la activación, expansión y maduración de células T.

A través de las moléculas HLA de clase II las CDs son capaces de presentar péptidos que pueden derivar tanto de antígenos endógenos como exógenos, por lo que tanto las CDs del receptor como las del donante juegan un papel en el desarrollo de EICH mediado por linfocitos T CD4+ (26,27). En cambio, las moléculas HLA de clase I presentan péptidos preferentemente derivados de la síntesis de proteínas de la propia célula, siendo por tanto las células nucleadas del receptor fundamentales en el desarrollo de la EICH mediada por linfocitos T CD8+ (26,27). No obstante, las CDs del donante son capaces de llevar a cabo una presentación cruzada mediante la cual moléculas HLA de clase I presentan péptidos derivados de antígenos adquiridos exógenamente (27).

En varios modelos de generación de EICH en ratón se pone de manifiesto que el desarrollo de EICH cutáneo es dependiente fundamentalmente de la función de las CDs del receptor mientras que en el caso del intestino están más implicadas las CDs del donante (28).

El estado de la maduración o activación de las CD8 también se ha relacionado con la aparición de la EICH (29) debido a que cuando las CD8 se activan aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD80 y CD86, favoreciendo la activación linfocitaria y por tanto la respuesta inmune.

En el trasplante alogénico el acondicionamiento conduce a un importante daño tisular lo que genera un ambiente pro-inflamatorio que favorece la maduración de las CD8.

En este sentido, el uso de terapias dirigidas hacia la eliminación de las CD8 (30) o bien el tratar de mantenerlas en un estado de inmadurez (31-35) podría disminuir el riesgo de EICH.

1.3.2. Linfocitos T reguladores

Los **linfocitos T reguladores** son una subpoblación especializada de linfocitos T. Esta subpoblación juega un papel fundamental en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica frente a lo propio. Los Treg se originan en el timo como una subpoblación de linfocitos T funcionalmente maduros o también pueden ser inducidos a partir de una población de linfocitos T vírgenes en la circulación periférica. La simple manipulación del timo y los linfocitos T, sin modificación de los antígenos propios, puede inducir la aparición de enfermedades autoinmunes en modelos de animales normales (36). La timectomía neonatal de cepas seleccionadas de ratones sanos da lugar a lesión de los tejidos como consecuencia de un proceso autoinmune (en tiroides, estómago, ovarios o testículos) y la presencia de autoanticuerpos en sangre periférica. De la misma manera, la timectomía en edad adulta de cepas seleccionadas de ratas sanas, seguido de varias sesiones de irradiación-X subletal, conlleva la aparición de Tiroiditis Autoinmunes o Diabetes Mellitus tipo 1. Sin embargo la inoculación de células T normales, en especial células CD4 o timocitos CD4+CD8 de animales

singénicos no tratados inhibe el desarrollo de procesos autoinmunes (37,38). De modo que las cepas normales no solo albergan linfocitos T autorreactivos potencialmente patógenos sino también los linfocitos T supresores necesarios para controlar a los primeros.

En 1995, Sakaguchi y col (39) distinguieron esta población de linfocitos T caracterizada porque tanto en ratón como en humano expresan basalmente CD25 (la cadena α del receptor de IL-2). Estos linfocitos tienen funciones supresoras y suponen un 1-3% de la población total de linfocitos de sangre periférica (40). En situación basal intervienen en el mantenimiento de la tolerancia evitando la activación y proliferación de células T potencialmente autorreactivas que hayan sido capaces de escapar de la selección negativa del timo (41).

Aunque se han descrito diferentes subtipos de linfocitos T con funciones reguladoras (42), los Treg naturales son la subpoblación mejor estudiada. El inmunofenotipo de los linfocitos Treg naturales se caracteriza por ser CD4⁺CD25^{high}, expresar Foxp3 (forkhead box P3) (43) y la falta o baja expresión de CD127 (44).

Foxp3 es un regulador fundamental del desarrollo y función de los linfocitos Treg (43, 45, 46). El gen Foxp3 fue identificado por primera vez como el gen deficiente en la cepa de ratón Scurfy. Las células T de esta cepa de ratón (deficientes de Foxp3) presentan un estado constante de activación y respuesta excesiva a la estimulación a través del TCR (47). Mutaciones en este gen desencadena en humanos el IPEX (síndrome de Inmunodeficiencia, Poliendocrinopatía, Enteropatía, ligado a X), caracterizado por graves fenómenos autoinmunes incluyendo enteropatía autoinmune, dermatitis, tiroiditis y diabetes tipo 1 (48). La transcripción del factor Foxp3 es fundamental para que tenga lugar en el timo la diferenciación a Treg. La transducción de Foxp3 en las células T vírgenes regula la expresión de CD25 así como de otras moléculas de superficie tales como CTLA-4 (en inglés, cytotoxic T cells associated

antigen-4) (49), CD62L (50) y GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene/protein) (51) mientras que reprime la producción de IL-2, IFN- γ e IL-4. La elevada sobreexpresión de Foxp3 es suficiente para conferir actividad supresora a linfocitos T normales no reguladores. Por todo ello, diversos autores han definido Foxp3 como el gen maestro controlador del desarrollo y función de las células reguladoras y es considerado el principal marcador molecular, a la fecha, de esta subpoblación reguladora.

La intensa expresión de CD25 en las Treg indica que son más dependientes de IL-2. De manera que el bloqueo de la vía de señalización del receptor de IL-2, desencadena procesos autoinmunes mediados por células T (52). Por lo que IL-2 es esencial en la función y desarrollo de los linfocitos Treg (53-55).

El receptor de IL-2 actúa a través de diversas vía de señalización como son PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT y la vía MAPK. En el caso de los linfocitos Treg, la vía PI3K/AKT/mTOR se encuentra inhibida debido a una expresión incrementada de PTEN (56-60). Esta propiedad confiere cierta resistencia natural de los Treg a la acción del sirolimus, lo que tiene importantes implicaciones terapéuticas en el contexto del trasplante y ha permitido la utilización de sirolimus para la expansión *in vitro* de linfocito Treg, y además ha demostrado *in vivo* preservar la viabilidad y funcionalidad de los Treg (61-64). Por ello, la señalización del receptor de IL-2 en los Treg está principalmente mediada por la activación de JAK1 y JAK3 con la consecuente activación de STAT5 que da lugar a la sobreexpresión de FoxP3 (65,66).

S. Sakaguchi y col. describieron cómo la ausencia de linfocitos Treg provocaba el desarrollo de enfermedades autoinmunes en modelo murino (67). En el contexto del trasplante alogénico alteraciones numéricas o funcionales de estos linfocitos se han relacionado con una mayor incidencia de EICH (68-72).

La activación del TCR converge a través de diversas vías de señalización en diferentes factores de transcripción. Así como NF- κ B y AP1 se relacionan con una respuesta inmunogénica no tolerogénica, NFAT está implicado en ambos tipos de respuesta inmunogénica y de anergia (73-76).

Por todo lo expuesto anteriormente, sería recomendable la búsqueda de nuevas estrategias dirigidas a preservar e incluso expandir los linfocitos Treg como profilaxis de la EICH en el contexto del trasplante alogénico.

1.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED

La EICH, está causada preferentemente por el efecto citotóxico de los linfocitos T del donante sobre tejidos y órganos vitales del paciente. Es la complicación más grave tras el trasplante con una incidencia de hasta el 80% en series de pacientes sometidos a TPH de donante no emparentado (77).

En los primeros trasplantes que se llevaron a cabo, se pudo comprobar que los pacientes que recibían médula ósea de donantes alogénicos desarrollaban un cuadro clínico denominado “enfermedad secundaria”. Las manifestaciones clínicas implicaban afectación de piel, tracto gastrointestinal e hígado y eran similares a las observadas en los niños inmunodeficientes que recibían transfusiones sanguíneas.

En 1966 Billingham (78) formuló los tres requerimientos necesarios para el desarrollo de la EICH:

- a. El injerto debe contener células inmunocompetentes.
- b. El receptor debe tener antígenos tisulares que no están presentes en el donante.

- c. El receptor debe ser incapaz de producir una respuesta efectiva para eliminar las células trasplantadas.

En el momento actual conocemos que estas células inmunocompetentes son linfocitos T y que la EICH tiene lugar cuando los linfocitos T son transferidos de una persona inmunocompetente a otra incapaz de eliminarlos (79,80).

La EICH se clasifica en aguda o crónica en función de la sintomatología. La primera suele aparecer durante los 3 primeros meses tras el trasplante y la segunda a partir de los 3 meses, con una mediana de aparición de 6-9 meses post-trasplante (81).

La incidencia de la EICH aguda tras el trasplante de donante emparentado es del 30-40% cuando se emplea profilaxis estándar (CsA o FK-506 más MTX) y la de EICH crónica del 50-70% con la misma profilaxis. En nuestra experiencia (82) aproximadamente un tercio de pacientes está recibiendo tratamiento inmunosupresor 5 años post-trasplante. La mediana hasta el fin de tratamiento inmunosupresor es de 23 meses (83) y un 15% de pacientes aún recibe tratamiento inmunosupresor 7 años post-trasplante (84).

La EICH se produce cuando los linfocitos T $\alpha\beta$ maduros del donante reconocen antígenos del complejo de histocompatibilidad mayor (o antígenos menores) presentados por las células presentadoras de antígenos (CPAgs). Como consecuencia, se produce una respuesta alorreactiva de los linfocitos del donante frente a antígenos del receptor.

Típicamente, desde el punto de vista fisiopatológico, la EICH aguda se divide en tres fases (29,85,86):

- Fase 1: *Activación de células presentadoras de Antígeno.*

Como consecuencia de la administración del régimen de acondicionamiento u otros procesos inflamatorios intercurrentes (por ejemplo infecciones) se produce un daño tisular en el receptor, que conlleva la liberación de citoquinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, IL-1), quimioquinas que aumentan la expresión de moléculas de adhesión en las CPAg, antígenos del CMH y moléculas co-estimuladoras. Todo esto da lugar a la activación de las CPAg, necesarias para el inicio de la respuesta inmune. La lesión de la mucosa gastrointestinal además permite la traslocación al torrente circulatorio de productos inflamatorios, tales como lipopolisacáridos, además de otros antígenos asociados a patógenos que también incrementan la activación de las CPAg del huésped (87). De hecho CC Hofmeister y col (88) comprobaron en modelos murinos que la irradiación corporal total da lugar a la activación de las CPAg locales de la piel.

- Fase 2: *Activación de células T del donante.*

Presentación de antígenos: las células T del donante se activan, proliferan y diferencian en respuesta al estímulo procedente de las CPAg del huésped. Estas células del huésped se unen, a través del complejo péptido/HLA, al receptor TCR de los linfocitos T del donante y ésta unión acompañada de las señales procedentes de las moleculares coestimuladoras termina generando la activación linfocitaria (29).

Citoquinas y quimioquinas: la activación y proliferación de los linfocitos T resulta en un aumento de la transcripción de genes de citoquinas y/o de sus receptores. Las citoquinas Th1 (proinflamatorias) son las más relacionadas con la EICH aguda. Los linfocitos T CD4 del donante, productores de IL-2, amplifican la respuesta aloinmune. En este sentido, el número de linfocitos productores de IL-2 se ha relacionado con la severidad de la EICH (89). Para el comienzo de la expansión de los linfocitos T además de la IL-2 también se necesita la interleuquina-15 (IL-15). El Interferón-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) facilita la presentación de antígenos aumentando la expresión de moléculas de adhesión,

de quimioquinas y de moléculas HLA y es además un mediador en el proceso de daño tisular. Por otra parte, las quimioquinas inflamatorias expresadas por los tejidos dañados son las responsables de la migración de las células inmunes a los órganos linfoides secundarios y a los tejidos diana. Los niveles de expresión de receptores de quimioquinas cambian con la estimulación celular. Se ha visto que los linfocitos T CCR5+, que generalmente producen citoquinas Th1, se asocian al desarrollo de EICH.

Para el desarrollo de la EICH se requiere, como se ha mencionado, que las células inmunocompetentes del injerto reconozcan proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad no expresadas en el donante, siendo también importantes las discrepancias a nivel de mHA en caso de sujetos HLA idénticos (18). Algunos mHA como el antígeno específico de varón H-Y desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de la EICH (90). La presentación de estas proteínas se lleva a cabo tras un procesamiento en el que intervienen complejos enzimáticos a nivel citoplasmático (proteosomas, animopeptidasas) que dan lugar a péptidos de 8-10 aminoácidos. Estos son posteriormente transferidos al retículo endoplásmico mediante el transportador TAP (“transporter associated with antigen procesing”). En el retículo endoplásmico se unen a moléculas HLA de clase I en el caso de proteínas endógenas o a moléculas HLA de clase II en el caso de proteínas exógenas, hecho que ocurre en las CPAg tras endocitosis o tras interacción con receptores de membrana C-type lectin receptors (CLR) o Toll-like receptors (TLR). Todos estos aspectos son importantes en la EICH porque esta intrincada maquinaria intracelular puede procesar de manera diferente en cada individuo una misma proteína (18) y por tanto dicha proteína puede ser reconocida como extraña por el linfocito T en función de la célula que la presente. Por otra parte, la expresión de mHAs restringida a determinados órganos (como el HA-1 y HA-2 en el tejido hematopoyético) abre la posibilidad de generar una respuesta inmune específica (efecto injerto contra leucemia). En todo este proceso, las CDs del paciente desempeñan un

papel crucial en el desarrollo de la EICH al presentar antígenos del receptor a los linfocitos del donante (29). No obstante, la presentación de antígenos por parte de las CDs no necesariamente conduce a la generación de una respuesta inmunogénica como previamente se ha comentado. Desafortunadamente, la situación en la que las células dendríticas se mantienen inmaduras se altera en el trasplante y la presencia de citoquinas como $\text{TNF}\alpha$, IL-1, LPS, etc..., favorecen la maduración de las CDs que pasan a expresar moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD83, CD86 y citoquinas como IL-12 o IL-18, lo que conduce a la activación linfocitaria (91,92).

Una vez que el antígeno ha sido procesado y presentado por la células dendrítica, la interacción del complejo HLA-antígeno con el receptor TCR-CD3 conduce a la activación de una serie de señales intracitoplasmáticas que finalmente provocan la activación linfocitaria. Sin embargo, para que el antígeno presentado por la CDs genere una respuesta inmunogénica, además de interactuar con el receptor TCR (señal 1), se debe producir también la activación de otras moléculas coestimuladoras en el linfocito T como CD28 o CD40L (señal 2). La ausencia de esta señal 2 puede dar lugar a una respuesta tolerogénica. Por tanto, una vez que el linfocito T interacciona con la CDs madura se activan una serie de tirosina quinasas que conducen a la fosforilación de ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) en la región intracitoplasmática del receptor TCR. Esto favorece el reclutamiento de ZAP-70 que a través de la Fosfolipasa C (PLC) genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) aumentando los niveles de Protein Kinasa-C y calcio en el citosol. El calcio activa la fosfatasa CaN lo que produce el paso al núcleo de factores de transcripción como NF-kB, NFAT o JNK, induciendo la activación y proliferación linfocitaria. Estos mismos factores de transcripción son activados también a través de las rutas de Fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K)-Akt y MAP-quinasas, que dependen de la estimulación del linfocito a través de las señales coestimuladoras (señal 2). Finalmente,

estas moléculas coestimuladoras también actuarían a través de CARMA-1, una proteína de membrana con actividad guanilato kinasa, que favorece el ensamblaje o acumulación de múltiples receptores en un “inmunosoma”. Este acúmulo de alrededor de 20 receptores en 100-100 nm de diámetro es necesario para generar una respuesta inmunogénica apropiada (93-95).

- Fase 3: *Fase efectora celular e inflamatoria.*

-Efectores celulares. Los principales efectores celulares en la EICH son los linfocitos T citotóxicos y las células NK, a través de sus mecanismos efectores de lisis celular, el sistema Fas/FasL y el perforina/granzima.

-Efectores inflamatorios. TNF α e IL-1 son producidas por monocitos y macrófagos tras su estimulación. TNF α activa las CDs y aumenta la presentación de aloantígenos.

1.5. PRESENTACIÓN CLÍNICA

La forma aguda se definía clásicamente como aquella que tiene lugar dentro de los primeros 100 días tras el trasplante. Sin embargo, el National Institutes of Health describe una nueva entidad, la EICH aguda tardía, que se produce más allá del día más 100 con las características clínicas e histológicas de la EICHa (81).

La EICHa es una entidad clínica-patológica caracterizada por la aparición de erupción cutánea, alteraciones intestinales y hepáticas (85) (tabla1 y 2)

1. *Piel:* es el órgano más comúnmente afectado y se caracteriza por un eritema maculopapuloso pruriginoso localizado o generalizado que puede cursar en los casos más graves con la formación de bullas o necrosis epidérmica (96). Se clasifican en diferentes grados (0-4) en función de la extensión y la gravedad (97).

2. *Hígado*: la alteración de las pruebas de función hepática es frecuente durante el periodo post-trasplante inmediato como consecuencia de la enfermedad venoclusiva, la toxicidad del acondicionamiento, infecciones virales, sepsis, sobrecarga férrica y otras causas de obstrucción biliar extrahepática. La afectación hepática secundaria a la EICH se caracteriza por un incremento de bilirrubina conjugada y fosfatasa alcalina como consecuencia de la afectación de los canalículos biliares produciéndose también un incremento de transaminasas. Se clasifica en cuatro grados en función de la cifra de bilirrubina.
3. *Afectación gastrointestinal*: puede cursar con la aparición de anorexia, náuseas, vómitos e intolerancia alimentaria, diarrea, dolor abdominal y en casos graves hemorragia e íleo (98). La presencia de hemorragia digestiva como resultado de la ulceración de la mucosa se asocia con un mal pronóstico (99).

Órgano	Grado1	Grado2	Grado3	Grado4
<i>Piel</i>	Rash <25% SC	25-50% SC	>50% SC	Eritrodermia generalizado con bullas
<i>Hígado</i>	Bi 2-3mg/Dl	3,1-6mg/Dl	3,1-15mg/dL	Bi >15mg/dL
<i>Intestino</i>	Diarrea>500mL/día	>1000mL/día	>1500mL/día	Diarrea>2000mL/día o dolor abdominal severo con o sin parálisis

Tabla 1: Grados de la EICH aguda. SC: superficie corporal, Bi: bilirrubina

Grado total	Piel	Hígado	Intestino
I	1-2	0	0
II	1-3	1	y/o 1
III	2-3	2-4	y/o 2-3
IV	2-4	2-4	y/o 2-4

Tabla 2: Criterios de Glucksberg para estadificar la EICHa.

1.6. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO DE LA EICH

Como se ha comentado anteriormente, la activación linfocitaria se produce a través de dos señales: una primera, mediada por el receptor tirosina quinasa, el receptor de la célula T (TCR/CD3) y una segunda señal mediada por la unión de moléculas coestimuladoras (CD80 en CDs y CD28 en LT). Esta doble estimulación es necesaria para la traslocación al núcleo, tras la activación de la CaN, de diversos factores de transcripción implicados, entre ellos NFAT, AP-1 y NFkB. A diferencia del factor de transcripción NFAT que se activa a través de la CaN en presencia de únicamente la señal mediada por TCR/CD3, para la activación y traslocación de NFkB se necesita además la activación linfocitaria a través de moléculas coestimuladoras.

1.6.1. Profilaxis/tratamientos que inhiben la activación de los linfocitos T

1.6.1.1. Inhibidores de calcineurina combinado con un curso corto de MTX.

Los estudios llevados a cabo por DE Uphoff (100) en ratones y R. Storb (101) y col en perros demostraron la eficacia del MTX, un antagonista del ácido fólico, mediante el bloqueo de la enzima dihidrofolato reductasa, para reducir la gravedad de la

EICH e incrementar la supervivencia de los receptores. El MTX se administra 24 horas tras el fin de la infusión de los progenitores en los días +1, +3, +6 y +11 post-trasplante. Pero la incidencia de EICHa grado III y IV (entre 10 y 15%) en las mejores condiciones posibles (emparentado, HLA idéntico, aplasia medular, acondicionamiento con ciclofosfamida) es elevada cuando se emplea el MTX como única droga inmunosupresora.

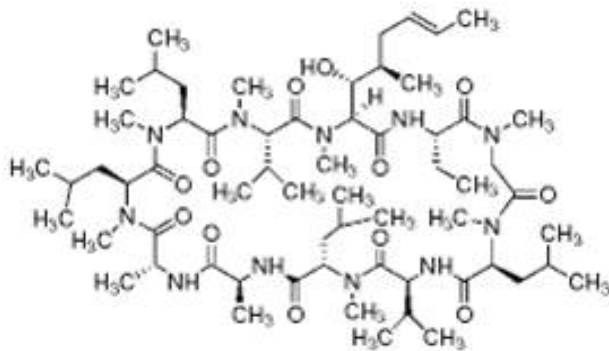


Fig 2: fórmula de la CsA ($C_{62}H_{111}O_{12}$)

Por otro lado, la CsA es un polipéptido cíclico formado por 11 aminoácidos de aproximadamente 1,2kDa de peso molecular, extraído del hongo *Tolypocladium inflatum* y que está disponible en clínica desde 1978 (fig 2). Se descubrió en 1973 y

pronto se constataron sus propiedades antiparasitarias, antifúngicas y su efecto inmunosupresor. El mecanismo de acción de la CsA se basa en su unión a un receptor de la inmunofilina intracelular [ciclofilina (CpN)]. Posteriormente, forma parte de un complejo CsA-ciclofilina que inhibe la actividad fosfatasa de la CaN. En 1986, el grupo de Seattle publicó los primeros resultados en los que se mostraba la superioridad del uso combinado de MTX más CsA frente a la CsA sola como profilaxis de la EICH tras trasplante alogénico en Leucemia mieloide crónica (102).

Desde entonces esta combinación pasó a ser el régimen convencional empleado por la mayoría de los centros trasplantadores hasta la actualidad (103), aunque la incidencia de EICH es elevada: hasta un 40% en trasplante de hermano HLA-idéntico y mayor en trasplante no emparentado.

El FK-506 es un macrólido derivado del hongo *Streptomyces tsukubaensis* descubierto en 1984 (fig 3). Es un potente inmunosupresor que, a nivel molecular, actúa mediante la unión a una proteína citosólica (FKBP12), responsable de la acumulación intracelular del compuesto. El complejo

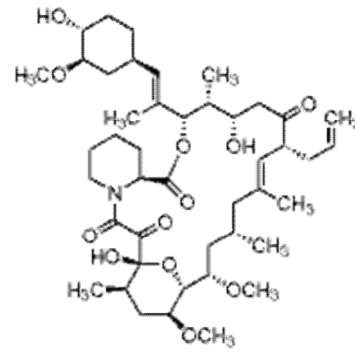


Fig 3: FK506 ($C_{44}H_{69}NO_{12}$)

FKBP12-FK-506 se une de forma específica y competitiva a la CaN, lo que produce una inhibición calcio-dependiente de las vías de transducción de señales en las células T

A principios de los años 90 el FK-506 comenzó a ser empleado en el trasplante hepático (104). En 1993 R. Storb y col (105) demostraron que el empleo de FK-506 y MTX mejoraba la supervivencia de perros sometidos a trasplante de donante HLA no idéntico. Esto permitió llevar cabo un ensayo clínico fase I/II y 2 ensayos prospectivos randomizados multicéntricos que comparaban MTX/CsA frente a MTX/FK-506: R. Nash y col (106) en pacientes con hemopatías malignas sometidos a trasplante de donante no emparentado y V. Ratanatharathorn y col (107) en pacientes también con hemopatías malignas tras trasplante de donantes emparentados. A pesar de que ambos estudios describen una reducción en la incidencia global de la EICH aguda (no de la crónica), la supervivencia de los pacientes tratados con MTX/FK-506 no era mejor e incluso era ligeramente inferior en los pacientes que recibían trasplante de donante emparentado.

Tanto la CsA como el FK-506 bloquean la acción de la CaN e inhiben la vía de señalización dependiente de calcio de los linfocitos T, bloqueando la producción de citocinas (IL-2), la capacidad apoptótica y la degranulación de linfocitos T citotóxicos. La CaN, también conocida como fosfatasa serina/treonina 2B, es una proteína heterodimérica con actividad enzimática dependiente de calcio y calmodulina. La CaN se encarga de la desfosforilación del factor nuclear de células T activadas (Nuclear factor

of activated T cells, NFAT) requerida para su traslocación al núcleo, donde forma un complejo con AP-1 para unirse al promotor de IL-2. A su vez también está implicada en la regulación de la actividad de I κ B, el inhibidor de NF- κ B, que tras su fosforilación da lugar a la traslocación al núcleo de NF- κ B y la activación del linfocito T.

Para que los linfocitos Treg puedan ejercer su función es necesario la interacción entre NFAT citosólico y FOXP3 (108-110). Según se ha demostrado en modelo de ratón la CsA, al interferir en la función de NFAT, afecta al desarrollo, a la expansión y a la función supresora de los linfocitos Treg (111,112). En los estudios *in vitro* llevados a cabo en células humanas se pone de manifiesto cómo la CsA afecta de forma intensa a la subpoblación de linfocitos Treg CD27+ (113-115). De hecho existen datos clínicos de pacientes sometidos a trasplante renal que indican que la CsA reduce la frecuencia de linfocitos Treg en comparación con otras drogas inmunosupresoras (116).

1.6.1.2. Mofetil micofenolato (MMF)

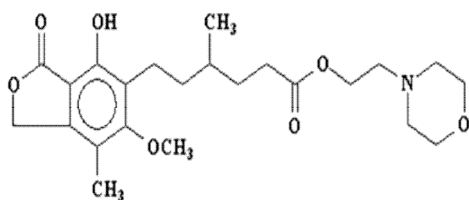


Fig 4: MMF ($C_{23}H_{31}NO_7$)

El micofenolato mofetilo (MMF) (fórmula $C_{23}H_{31}NO_7$, con un peso molecular de 433.50D) (fig4) es el éster 2-morfolinoetílico del ácido micofenólico (MPA). Es un selectivo y potente inhibidor, no competitivo y

reversible de la inosina monofosfato deshidrogenasa. Inhibe, por tanto, la síntesis *de novo* del nucleótido guanosina, bloqueando su incorporación al ADN. De este modo, el MMF inhibe la proliferación linfocitaria. Dado que los linfocitos T y B dependen de la síntesis *de novo* de purinas para su proliferación, otros tipos de células pueden utilizar otros mecanismos de rescate. El MPA ejerce su acción fundamentalmente en los linfocitos. Se ha empleado en combinación con la CsA para evitar las toxicidades más

limitantes del MTX: mucositis y neutropenia. En un ensayo randomizado en el que se incluyó un número pequeño de pacientes (117) la combinación de CsA/MMF frente a CsA/MTX mostró una incidencia similar de EICH aunque menor mucositis orofaríngea y un injerto hematopoyético más precoz. Se está empleando en algunos centros en sustitución del MTX y es una opción en los trasplantes de cordón umbilical por el rápido injerto de neutrófilos.

1.6.1.3. Sirolimus

El sirolimus (también conocido como Rapamicina) se descubrió en la isla de Pascua a partir de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (118,119). Aunque su estructura es similar a la del FK-506, no es un inhibidor de CaN sino que es un lactona macrocíclica con propiedades antifúngicas (118,119), antitumorales (120,121), e inmunosupresoras (122). Es insoluble en agua y altamente lipofílica con un anillo macrólido de 31 miembros. Su fórmula química es $C_{51}H_{79}NO_{13}$ y su peso molecular 914,2D.

El sirolimus (fig 5) inhibe la activación de las células T, mediante el bloqueo de la transducción de señales intracelulares dependientes e independientes de calcio. Su mecanismo de acción se basa en la unión del fármaco a las proteínas citosolicas FKBP-12 (del inglés *FK-binding protein 12*). El complejo

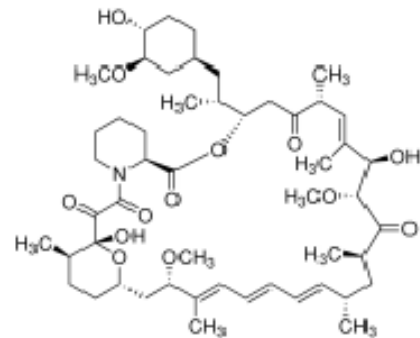


Fig 5: sirolimus ($C_{51}H_{79}NO_{13}$)

sirolimus/FKBP12 inhibe la activación de la Molécula Diana de la Rapamicina en mamíferos (mTOR) (del inglés *mammalian target of rapamycin*) crítica para la progresión del ciclo celular, debido a que forma parte de la vía de señalización celular PI3K/AKT (123-125).

mTOR, es una proteína kinasa serina/treonina con un peso molecular aproximado de 289KDa, perteneciente a la familia de kinasas relacionadas con PI3K,

implicada en la regulación del crecimiento, proliferación, motilidad y supervivencia celular así como la síntesis proteica y la transcripción celular (126-128). Existen dos complejos que contienen mTOR (129): el complejo sensible a la rapamicina (también llamado complejo *mTOR-1* o *mTORC1*), definido por su interacción con la proteína raptor (regulatory-associated protein of mTOR) (130-132) y un complejo insensible a rapamicina (también llamado complejo mTOR2 o mTORC2) (133) que se define por su interacción con rictor ("rapamycin-insensitive companion of mTOR") (134). Mientras que el complejo mTOR-1 se encarga de regular el crecimiento celular a través de S6K1 y el factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1 (4E-BP1), el complejo rictor-mTOR controla el citoesqueleto de actina (134,135) así como Akt/PKB (136,137).

mTOR pertenece a la ruta de señalización de PI3K/Akt/mTOR (138). Receptores tirosina quinasa en respuesta a factores de crecimiento y citoquinas (como por ejemplo IL-2) se fosforilan y dan lugar al reclutamiento de PI3K en la membrana (139). PI3K transfiere un grupo fosfato del ATP al fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂), generando fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) y ADP. En contrapartida PTEN ejerce un efecto antagonista a PI3K defosforilando PIP₃, de manera que actúa como regulador negativo de esta vía (138,140). PIP₃ une la seronina quinasa Akt a la cara interna de la membrana, la cual es fosforilada por PKD1 y activada (141-143). Akt da lugar a la inactivación del complejo de esclerosis tuberosa (TSC) (144-146). Este complejo está formado por TSC1 (hamartina) y TSC2 (tuberina), e inhiben la proteína Rheb, por lo que al ser inactivado el complejo por Akt, Rheb activa mTOR (fig 6) (147).

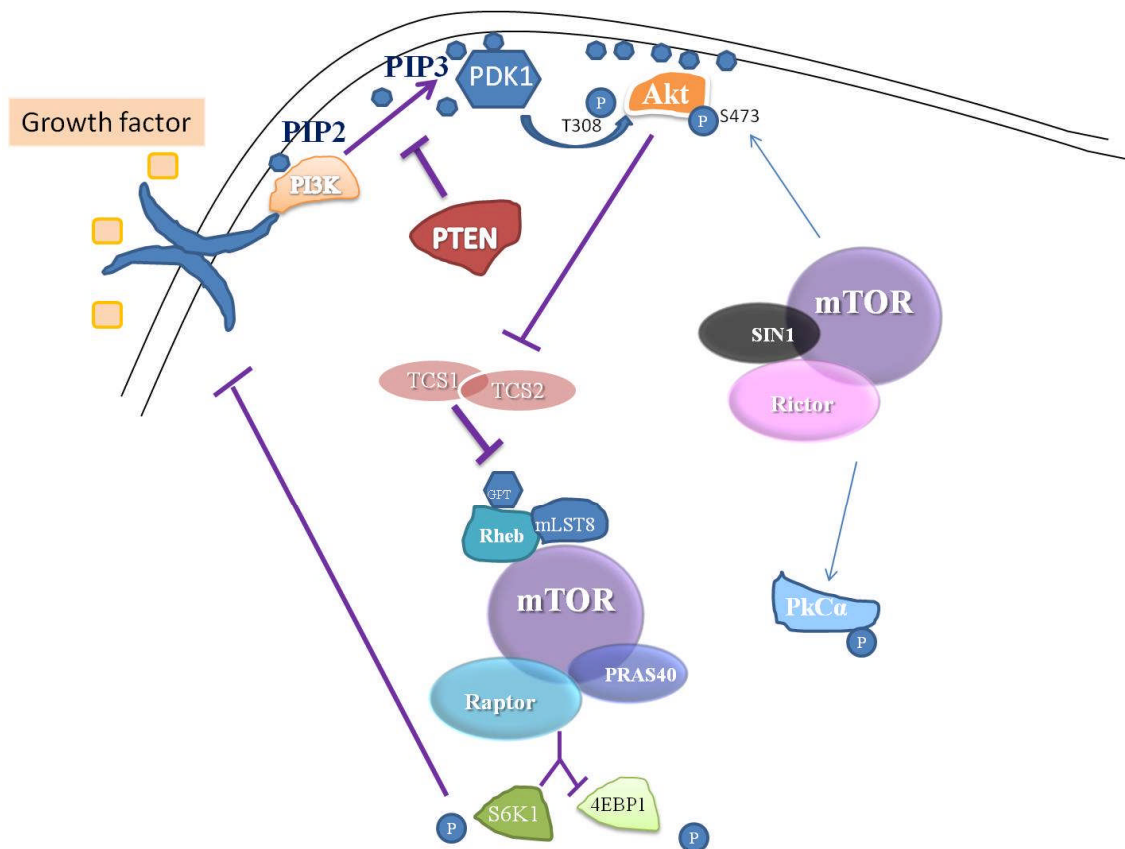


Fig 6: vía de señalización PI3K/Akt/mTOR

Otras funciones de Akt son inactivar proteínas con actividad apoptótica como BAD y caspasa 9 (148) y actuar sobre la función de diversos factores de transcripción, entre ellos factor nuclear kappa B (NF- κ B) (149). Akt fosforila IKK, activándolo y este a su vez fosforila I κ B, lo cual permite la ubiquitinación y degradación por el proteosoma de I κ B.

Sirolimus bloquea la vía PI3K/Akt/mTOR, a través de la inhibición del TORC1 (150), lo cual evitaría la activación de los linfocitos T convencionales al interferir en la vía señalización estimulada por la señal 2 (123). Por el contrario en los linfocitos T reguladores la vía PI3K/AKT/mTOR se encuentra inactiva debido a una mayor bloqueo por parte de PTEN (151) lo que confiere a los Treg cierta resistencia natural a la acción

del sirolimus, como previamente se ha explicado. El sirolimus se ha empleado con éxito para la expansión *in vitro* de Treg e *in vivo* ha mostrado preservar el efecto supresor de los Treg (61-64).

El Dana Farber Cancer Institute (DFCI) es probablemente el centro con más experiencia en el uso del sirolimus en la profilaxis de EICH. En un pequeño ensayo clínico fase II demostraba una excelente eficacia de la combinación de sirolimus con FK-506 en la que la incidencia de EICH agudo grado III-IV fue inferior al 5% en pacientes sometidos a TPH de sangre periférica de donante emparentado o no emparentado (151). Posteriormente este grupo ha confirmado estos resultados en series más grandes de pacientes. Actualmente se está llevando a cabo un ensayo clínico multicéntrico randomizado para comparar la combinación FK-506/MTX vs FK-506/sirolimus.

Los efectos secundarios descritos con mayor frecuencia son toxicidad renal, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, síndrome hemolítico-urémico y citopenias. La combinación de un inhibidor de CaN con el sirolimus incrementa el riesgo de aparición de MTAT o enfermedad veno-oclusiva tras acondicionamiento mieloablativo (152-154), bloquea el desarrollo de Treg y por lo tanto evita que se genere una respuesta inmunotolerante (155).

1.6.2. Profilaxis/tratamiento de la EICH basado en la depleción T

La depleción T se puede llevar a cabo por: selección negativa de las células T *ex vivo*, selección positiva de las células CD34+ y, por último, administración *in vivo* de anticuerpos anti-célula T. Todas las modalidades eliminan los linfocitos T de forma inespecífica. Por lo tanto, no solo disminuyen el riesgo de EICH sino que también pueden afectar a la EICL y aumentar el riesgo de infecciones. De hecho, la depleción T se ha mostrado eficaz a la hora de disminuir la incidencia de la EICH aguda y crónica,

pero estas estrategias no se han asociado a una mayor supervivencia debido al aumento del riesgo de infecciones graves, recaídas, fallo de implante y síndromes proliferativos asociados a infección por Virus Epstein-Barr (156,157).

1.6.2.1. *Timoglobulina (ATG)*

El ATG es un anticuerpo policlonal que se obtiene tras inmunización de conejos con timocitos. En un estudio con un largo seguimiento se evidenció una mejoría en la calidad de vida de los pacientes que reciben ATG al disminuir el riesgo de EICH crónico extenso y las complicaciones pulmonares tardías (158).

1.6.2.2. *Alentuzumab*

Es un anticuerpo monoclonal anti-CD52, proteína expresada por un amplio espectro de leucocitos: linfocitos, monocitos y células dendríticas. De nuevo en dos estudios prospectivos se constató una menor incidencia de EICH frente a la terapia estándar, pero una mayor tasa de complicaciones infecciosas así como de recaídas y fallo de injerto (160).

1.6.3. Nuevas estrategias de profilaxis y tratamiento de la EICH

1.6.3.1. *Inhibidores del proteosoma*

El Bortezomib [ácido N-pirazinacarbonil-L-fenilalanina-L-leucina-borónico] (fig 7) es el primer inhibidor del proteosoma empleado en clínica, actualmente aprobado como tratamiento quimioterápico para el Mieloma Múltiple (160-

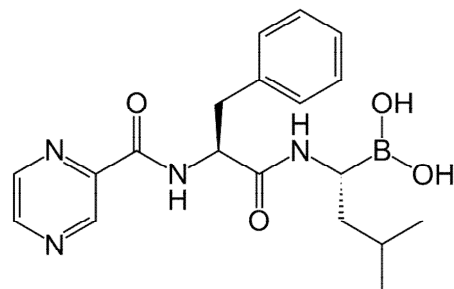


Fig 7 Bortezomib $C_{19}H_{25}BN_4O_4$

162). Es un ácido dipeptidil borónico modificado, derivado de leucina y fenilalanina, y su peso molecular es de 384,25 daltons. Inhibe de forma selectiva y reversible el proteosoma 26S, por lo que interfiere la vía ubiquitina-proteosoma. El sistema

ubiquitina-proteosoma controla funciones básicas tales como la progresión del ciclo celular, señal de transducción y la muerte celular programada. Es esencial en la degradación de proteínas intracelulares en las células eucariotas, por lo que está presente en todas las células eucariotas, tanto en el núcleo como en el citoplasma.

El proteosoma 26S es una proteasa multicatalítica dependiente de adenosina trifosfato (ATP) con un peso molecular de 2000kDa. Esta proteasa degrada tanto proteínas ubiquitinadas, dañadas, oxidadas o con plegamiento anormal como proteínas reguladoras que controlan el ciclo celular, la activación del factor de transcripción, la apoptosis y el intercambio celular (163). Por lo tanto la degradación proteosómica es un mecanismo esencial en el ciclo celular, expresión génica y en respuesta al estrés oxidativo.

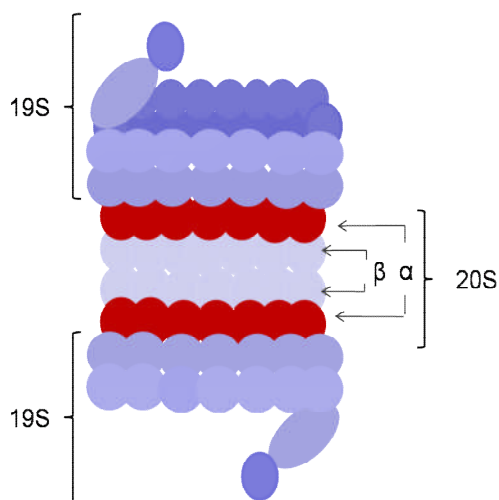


Fig 8 Estructura del proteosoma 26S

La estructura del proteosoma 26S (fig 8) está conformada por una partícula central, core 20S y 2 subunidades reguladoras 19S. La partícula 20S es un cilindro compuesto de cuatro anillos apilados, cada uno de los cuales contiene siete subunidades α o β (fig 8). Mientras que las subunidades α son fundamentalmente estructurales, las β se encargan de las funciones catalíticas. Las

subunidades reguladoras 19S están involucradas en el reconocimiento, unión y despliegue de las proteínas ubiquitinadas y en la regulación de la apertura de la unidad central 20S.

La ubiquitina (161) es un polipéptido de 76 aminoácidos que se expresa en todas las células eucariotas. A través de la coordinación secuencial de tres enzimas: E1

(enzima activadora de ubiquitina), E2 (enzima de conjugación de ubiquitina) y E3 (ubiquitina ligasa), la ubiquitina se activa y se une covalentemente a los posibles sustratos del proteosoma.

Mediante este sistema tiene lugar la degradación transitoria de diversas proteínas reguladoras durante el ciclo celular, imprescindible para que la célula progrese a lo largo del ciclo celular y entre en mitosis. Entre estas proteínas destaca el supresor tumoral p53, que actúa como regulador negativo del crecimiento celular. Así mismo, es necesaria para la regulación transcripcional.

NF- κ B es un factor clave de transcripción implicado en la regulación de la respuesta inmune; el proteosoma degrada el inhibidor de NF- κ B, I κ B y permite la traslocación al núcleo de NF κ B y su actividad transcripcional (164,165).

NF κ B son factores de transcripción pertenecientes a la familia REL que se traslocan al núcleo desde el citoplasma en respuesta al estímulo celular (166,167). NF κ B se encarga de la regulación de las moléculas de adhesión celular (CAM) tales como la E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, del control antiapoptótico (168) y la regulación del ciclo celular. NF- κ B está implicado tanto en la activación de los linfocitos T como en la maduración de las CDs (169,170). Además LPS o CpG del DNA de virus y bacterias estimulan los TLR e inducen la maduración de las CDs a través de diversas vías que finalmente convergen en NF- κ B (171,172). Al contrario que NFAT su activación es esencial para el papel inmunogénico de las células T pero no para una respuesta tolerogénica. Así para que tenga lugar la activación del linfocito T convencional se debe producir la estimulación tanto del receptor TCR/CD3 como de moléculas coestimuladoras, de manera que las vías de señalización convergen en la activación de los factores de transcripción AP-1, NFAT y NF κ B. Si inhibimos NF- κ B la señal que llega al linfocito T está sólo mediada por el TCR/CD3 y por lo tanto se produce una respuesta anérgica en el linfocito (fig 9).

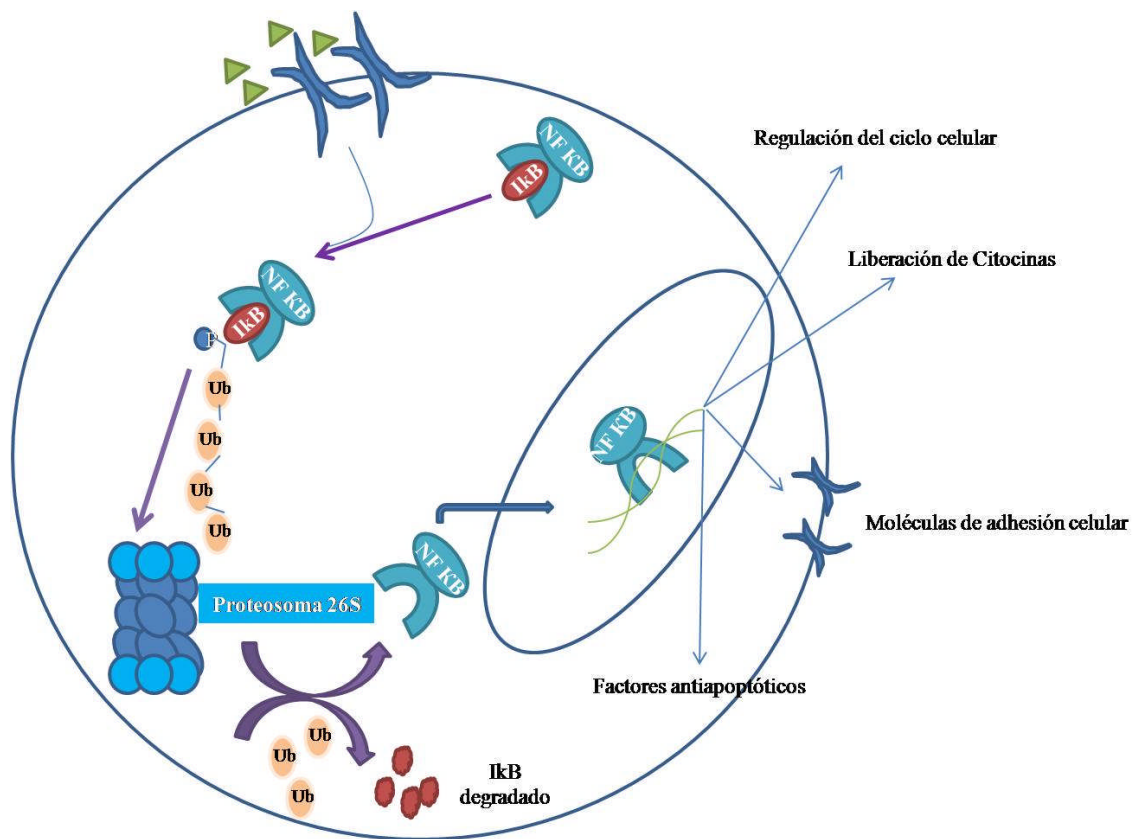


Fig 9: Ubiquitinación y degradación de IκB por el proteosoma

El Bortezomib impide la degradación de las proteínas ubiquinadas, entre ellas la del inhibidor de NFκB, IκB, al ser un inhibidor selectivo y reversible del proteosoma. Por lo tanto el bortezomib inhibe la función de NF-κB, evitando así la activación de todos los procesos celulares en los que éste está implicado, como la activación o la proliferación linfocitaria. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto que el bortezomib *in vitro* induce un efecto apoptótico específico sobre linfocitos T alorreactivos tras un cultivo mixto disminuyendo la producción de citoquinas Th1 (173). Estos hallazgos se confirmaron en modelos animales por K. Sun y col. al mostrar como el bortezomib administrado en el periodo inmediato post-trasplante disminuye el riesgo de EICH aguda preservando el efecto injerto contra tumor (174,175). Todas estas consideraciones han sido la base para el desarrollo de ensayos

clínicos que se basan en el efecto proapoptótico del fármaco sobre los linfocitos alorreactivos. En este sentido, Koreth y col. han demostrado en un ensayo clínico de la DFCI que el bortezomib en combinación con el FK-506 y metotrexate reduce el riesgo de EICH (incidencia acumulada en el día +180 post-trasplante de EICH grado II-IV del 13%) (176).

2. HIPÓTESIS

La traslocación de NF- κ B al núcleo constituye un elemento central de la activación tanto de las CD4 como de los linfocitos T convencionales. Por el contrario, la escasa información disponible en la literatura sugiere que NF- κ B no juega un papel relevante en la activación de los linfocitos T reg.

Por tanto, los linfocitos Treg podrían ser resistentes al efecto proapoptótico que ejercen los inhibidores de proteosoma sobre los linfocitos convencionales activados.

Si esta hipótesis es correcta, la combinación de un inhibidor de proteosoma junto con un inhibidor de la vía de mTOR podría actuar de manera sinérgica inhibiendo la activación linfocitaria y preservando/expandiendo linfocitos T reguladores

Finalmente, el bloqueo de NF- κ B mediante el uso de inhibidores de proteosoma evitaría la maduración y activación de las CD4 que se mantendrían en un estado inmaduro pudiendo de este modo favorecer una respuesta inmune tolerogénica.

Por tanto la utilización de inhibidores de proteosoma puede prevenir la EICH, de manera que la aplicación de estas hipótesis puede ser de gran utilidad en el trasplante hematopoyético.

3. OBJETIVOS

3.1. EN RELACIÓN CON EL EFECTO DEL BORTEZOMIB SOBRE LOS LINFOCITOS T REGULADORES Y ALORREACTIVOS

Comprobar el efecto del bortezomib sobre la viabilidad y funcionamiento de los linfocitos Treg en comparación con los linfocitos T activados

3.2. EN RELACIÓN CON EL EFECTO DEL BORTEZOMIB SOBRE LA ACTIVACIÓN Y MADURACIÓN DE LAS CDS

Comprobar si el bortezomib es capaz de inhibir la maduración de las CDs favoreciendo de este modo el desarrollo de una respuesta inmunotolerante

3.3. EN RELACIÓN CON LA COMBINACIÓN DE BORTEZOMIB Y SIROLIMUS

Comprobar si la combinación de ambos fármacos actúa de manera sinérgica en la inhibición de la activación y proliferación linfocitaria *in vitro* y analizar su eficacia como profilaxis de EICH en un modelo murino.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Material biológico

4.1.1.1. Obtención de células para cultivo

Los estudios *in vitro* de linfocitos T y CDs se realizaron a partir de concentrados leuco-plaquetarios (*Buffy-Coat*), procedentes de hemodonaciones de donante sano extraídos en sistema de bolsa LQT 6280 (Macopharma). Las muestras empleadas se obtuvieron tras el correspondiente consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos y Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca bajo estrictas condiciones de esterilidad.

4.1.1.2. Animales

Los experimentos relacionados con investigación animal se llevaron a cabo en el Animalario de la Universidad de Salamanca de acuerdo con las normas establecidas por el Comité Ético del Animalario.

Se utilizaron las siguientes cepas de ratón: hembras BALB/c (H2d), machos C57BL/6 (H2b) y NOD/SCID NOD.CB17-Prkdc^{scid}. Todos los ratones procedieron de *Charles River Laboratory* (France).

4.1.1.3. Líneas celulares

Para los estudios de Western-blot se empleó la línea celular T JURKAT procedente de American Type Culture Collection (ATCC).

Para la generación de leucemia mieloblástica en ratones BALB/c se empleó la línea celular mielo-monocítica WEHI 3b d+ clon 17.3 GFP+.

4.1.2. Material no biológico (reactivos)

A continuación se enumeran los reactivos necesarios para llevar a cabo los experimentos:

-fármacos: El bortezomib fue suministrado por Millennium Pharmaceuticals Inc. (Massachusetts, EEUU), sirolimus y CsA de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)

-En la realización de los cultivos empleamos: El medio de cultivo (RPMI), el tampón salino Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X (PBS) y los antibióticos (Penicilina 10⁴U/mL y Estreptomicina 10⁴µg/mL) de GIBCO® Invitrogen™ (Paisely, UK). El suero humano AB y el medio Hanks's Balanced Salt Solution 1X con 0.35g/L NaHCO₃ (HBSS) de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). El suero fisiológico Viaflo Cloruro Sódico 0,9% pH 5,5 procedió de los laboratorios Bartex S.L. (Valencia, ESP). El Medio oleoso para la separación de células mononucleadas (Ficoll-Paque) de GE-Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, EEUU). La heparina libre de aditivos 5000U/ml procede de Biochrom AG (Berlin, Alemania). Para la activación de los cultivos de linfocitos T usamos anticuerpos monoclonales anti-human CD3 y anti-human CD28 de Becton Dickinson Biosciences, (San Jose, CA, EEUU). Para la separación de linfocitos T CD4⁺ empleamos CD4⁺ T Cell Isolation Kit y para la población T CD4⁺CD25⁺ el CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cell Isolation Kit, ambos de Miltenyi Biotec, Bergisch Glabach, Germany. La población de linfocitos T CD4⁺CD25⁻ se obtuvo mediante microbolas magnéticas anti-CD25 de Miltenyi Biotec. Todas las separaciones magnéticas se llevaron a cabo en el AutoMACS Separator de Miltenyi Biotec. La IL-2 utilizada en los cultivos a largo plazo de linfocitos T CD4⁺ fue suministrada por R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Las citoquinas que empleamos para la diferenciación de las CDs fueron GM-CSF de PeProtech e IL-4 de R&D. Para la activación de las CDs se usó TNFα de R&D System y LPS de Sigma-Aldrich. Las

placas de cultivo de 96 pocillos con el fondo en U utilizadas son de Becton Dickinson Labware Europe mientras que las placas de 48 pocillos con el fondo plano son de Costar®. El dimetil sulfóxido (DMSO) es de Sigma-Aldrich.

- En los estudios de citometría: la brefeldina A procede de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); el marcaje de las células con PKH se realizó mediante el PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit, “for general cell membrane labeling”; el Kit de permeabilización IntraStain para el marcaje intracelular, de DakoCytomation (Denmark). Los estudios de viabilidad se llevaron a cabo con el kit de Anexina-V, 7-amino-actinomicina-D (7-AAD) de BD Pharmingen™ BD, (San Diego, EEUU) y la determinación de los eventos absolutos anexina-V se obtuvo con los tubos Trucount de BD Biosciences. Los estudios de expresión proteica del gen *FOXP3* en linfocitos T se desarrollaron con el kit de FOXP3 Staining Buffer Set de eBioscience (San Diego, CA, EEUU). Para llevar a cabo el estudio de citoquinas solubles usamos Human Th1/Th2 Cytokine Kit II para las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Utilizamos el citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson Bioscience San Jose, CA, EEUU) y los programas informáticos: CellQuest®, PAIN-A-GATE-PRO™ de (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA, EEUU), ModFit LT for Mac (Verity Software House, Inc, ME, EEUU) e Infinicyt1.1 (Cytognos S.L. Salamanca, España).

-En los estudios de expresión génica de FOXP3 necesitamos el kit comercial de Qiagen AllPrep DNA/RNA microkit de Valencia CA, USA para la extracción de ARN, y el equipo ABI PRISM 7900HT Sequence Detection de Applied Biosystems

- En los estudios de Western blot, las membranas de PVDF inmobilon P fueron de Millipore Corp. (Bedford, Mass.). Los anticuerpos monoclonales anti-caspasa 3, 8 y 9 de conejo procedieron de BioSciences y los anticuerpos antiErk de ratón de Santa Cruz Biotechnology, Inc y anti-pAkt de conejo de Cell Signaling. El anticuerpo monoclonal

anti-tubulina de Santa Cruz Biotechnology, Inc. El anticuerpo secundario anti-conejo o anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano fue de GE Healthcare (Little Chalfont, UK) y Amersham TM. Las bandas se visualizaban con ECL Western Blotting Detection Kit de Amersham TM.

-Para los estudios de secreción de INF γ , IL-2 e IL-10 de las CDs empleamos el Kit comercial ELISA (Diaclone, Besancon Cedex, France).

-En el modelo animal utilizamos: placas de petri estériles de 100mm de Soria Genlab, S.A., filtros con tamaño de poro de 40 μ m de Becton-Dickinson, Biosciencie, San José, CA, agujas de 25G (0,5mm x 16mm) de BD MicrolanceTM (BD Drogheda, Irland), jeringas de 1ml de BD Plastipak (BD Madrid) y agujas de insulina de 27G (0.4 x 12mm) de TERUMO[®]. El acondicionamiento pretrasplante de los ratones se llevó a cabo mediante un irradiador de muestras biológicas Gammacell 1000 con una fuente de Cesio de 137.

- El análisis informático se realizó mediante el programa estadístico SPSS software program (SPSS 11.0, Chicago IL).

-Los anticuerpos monoclonales, empleados para análisis por citometría de flujo fueron:

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Procedencia
CD3	PE	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD3	PerCp	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD3	APC	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD4	PerpCp Cy5.5.	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD4	APC	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD25	FITC	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience

			San Jose CA USA
CD25	PE	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD40	PE	Mouse IgG ₁	Beckman Coulter Company Marselle France
CD40L	APC	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD80	PE	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD83	PE	Mouse IgG ₁ κ	BD Pharmingen San Jose, CA USA
CD86	PE	Mouse IgG ₁ κ	BD Pharmingen San Jose, CA USA
CD127	PE	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
FOXP3	APC	Rat IgGα κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
IFNγ	PE	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
HLA-DR	PerCp	Mouse IgG2a κ	Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
Exclusion kit for CDs: CD3, CD19, CD56, CD14	FITC	Mouse IgG2a, IgG1, IgG2b, IgG2a, respectivamente	Cytognos Salamanca Spain
BD human Th1/Th2 Cytokine CBA kit	PE		Becton Dickinson Bioscience San Jose CA USA
CD3	Alexa Fluor	Rat IgG2b κ	BD Pharmingen San Jose CA USA
CD34	Alexa Fluor	Rat IgG2b κ	BD Pharmingen San Jose CA USA
CD45	PerCp Cy5.5.	Mouse IgG2b κ	BD Pharmingen San Jose CA USA
H2Db	FITC	Mouse IgG2b κ	BD Pharmingen San Jose CA USA
H2Dd	PE	Mouse IgG2a κ	BD Pharmingen San Jose CA USA

Tabla 3: En todos los casos se añadieron los anticuerpos a concentración de saturación: **FITC**: Isotiocianato de Fluoresceína; **PE**: Ficoeritrina; **PerCP Cy 5.5**: Proteína piridinín clorofílica cianina 5.5; **APC**: Alofocianina.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Cultivos

Todas las células se manipularon en campana de flujo laminar y se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C en una atmósfera de humedad y con un 5% de CO₂.

Los concentrados leucoplaquetarios (*Buffy coats*) se diluyeron con suero fisiológico en una proporción 1:8 y se separó la fracción mononucleada mediante centrifugación (1600rpm durante 30 minutos) por gradiente de densidad con Ficoll. Tras la centrifugación se recogió la interfase de células mononucleadas con pipetas pasteur estériles. Posteriormente se lavaron 2 veces con la solución HANKS a 1200 rpm durante 10 minutos. Tras el segundo lavado con HANKS, retiramos el sobrenadante y resuspendimos las células en RPMI suplementado con suero AB 10% y antibiótico 1%. Momento en el que se procedió al recuento celular mediante cámara de Neubauer.

4.2.2. Estudios in vitro de bortezomib y Treg

4.2.2.1. Obtención de células T CD4+, T CD4+CD25+ y T CD4+CD25

4.2.2.1.1 Obtención de células T CD4+

A partir de la fracción mononucleada procedente de los concentrados leucoplaquetarios se separaron los linfocitos T CD4+ empleando el CD4+ T Cell Isolation Kit II. Realizamos el procedimiento según el protocolo del fabricante. Centrifugamos a 1200 rpm durante 10 minutos, resuspendimos el botón celular en buffer, añadimos un coctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma\delta$ y glicoforina A) e incubamos durante 10 minutos a 4-8° en oscuridad. Tras esta incubación añadimos de nuevo Buffer y antibiotina conjugada con microbolas magnéticas. Volvimos a incubar 15 minutos en frio y oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, lavamos, centrifugamos y

resuspendimos en un volumen de buffer de 500µl. Para la separación inmunomagnética empleamos el programa “Deplete” del AutoMacs Separator y recogimos la fracción negativa enriquecida en linfocitos T CD4+.

4.2.2.1.2 Obtención de células T CD4+CD25+ y T CD4+CD25-

Para la selección de la población de linfocitos T CD4+CD25+ empleamos el Kit CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit. El proceso comienza con la selección de los linfocitos T CD4+, mediante el marcaje indirecto con el coctel de anticuerpos conjugados con biotina y las microbolas magnéticas conjugadas con antibiotina, tal y como especificamos en el apartado 4.2.2.1.1. A la selección de células T CD4+ se le añadieron posteriormente microbolas magnéticas conjugadas con anti-CD25 que se incubaron durante 15 minutos a 4-8°C. Trascurrido este tiempo, lavamos, centrifugamos y resuspendimos en buffer. Para la separación inmunomagnética empleamos el programa “Posseld” del AutoMacs y recogimos los linfocitos TCD4+CD25+ en la fracción positiva del separador celular.

La selección de la población de linfocitos T CD4+CD25-, se hizo también a partir de la fracción celular CD4+. Empleamos microbolas magnéticas anti-CD25 pero en este caso usamos el programa “Depletes” y por tanto, recogimos la selección de linfocitos T CD4+CD25- en la fracción negativa del separador celular AutoMacs.

4.2.2.2 *Estudios de viabilidad de linfocitos Treg tratados con bortezomib (PKH/CD25/7AAD/CD4).*

Con el propósito de conocer el efecto que ejerce el bortezomib sobre la viabilidad de linfocitos Treg, nos planteamos cultivar durante 5 días linfocitos T CD4+CD25+ con linfocitos T CD4+CD25- de la misma muestra, en placas de 48 pocillos en ausencia y presencia de bortezomib.

Con el fin de diferenciar en la población de linfocitos T CD4+ las células CD25+, separamos con microbolas magnéticas antiCD25 y marcamos con el colorante verde fluorescente PKH, de esta manera podemos hacer un seguimiento celular *in vitro*. Para este procedimiento empleamos el kit PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit. Este kit consta de una solución acuosa (el diluyente C) que mantiene la viabilidad de las células, a la vez que maximiza la solubilidad del colorante y su eficiencia de tinción durante el marcaje. 5×10^6 células CD4+CD25+, se resuspendieron en 250 μ L del diluyente C. A esta solución se le añadió 250 μ L de la solución de PKH (250 μ L del diluyente C suplementado con 1 μ L de PKH 67). Las células se incubaron durante 4 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo, agregamos 500 μ L de suero AB y después de un minuto más de tiempo, terminamos el proceso añadiendo 1mL de medio completo de RPMI. Las células se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en medio completo. Una vez identificados los linfocitos T CD4+CD25+PKH+, esta población se mezcló de nuevo con los linfocitos T CD4+CD25- y 5×10^5 células de la mezcla de ambas poblaciones se sembraron en una placa de 48 pocillos, en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de bortezomib (100, 500 o 1000nM). Planteamos tres situaciones distintas:

1. Control: Linfocitos T CD4+CD25+PKH+ y Linfocitos T CD4+CD25-
2. Cultivo mixto: los linfocitos T CD4+CD25+PKH+ y linfocitos T CD4+CD25- co-cultivados con células mononucleadas alogénicas irradiadas con 15Gy
3. Cultivo estimulado de los linfocitos T CD4+CD25+PKH+ y linfocitos T CD4+CD25- con anti-CD3 humano (5 μ g/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5 μ g/mL). Se añadió anti-CD3 en 100 μ l de PBS en cada pocillo durante dos horas a 37°C, para favorecer su adherencia a la placa. Pasado este tiempo se retiró el anti-CD3 y bloqueó con medio completo durante una hora a 37°C. Finalmente a la mezcla celular se le añadió anti-CD28.

Transcurridos los 5 días de cultivo se recogieron las células de la placa de 48 pocillos y se centrifugaron en tubos de citometría a 1200 rpm durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante. Las células se resuspendieron en PBS y se marcaron con CD25-PE y CD4-APC durante 15 minutos. Después de lavar con PBS, las células se resuspendieron nuevamente en PBS y se llevó a cabo el marcaje con 7-AAD. Inmediatamente después las células se adquirieron en el citómetro FACSCalibur y utilizamos el programa informático CellQuest®. Con el programa Paint-A-Gate se analizó el porcentaje de células viables (7AAD-) de cada población de estudio:

-Células T reguladoras PKH+CD25+

-Células T convencionales en reposo: PKH-CD25-

-Células T convencionales activadas: PKH-CD25+

4.2.2.3 Cultivos a largo plazo de linfocitos T CD4+ o CD4+CD25-

Con el fin de averiguar si un inhibidor de proteosoma era capaz de generar linfocitos Treg *in vitro*, llevamos a cabo cultivos de cuatro semanas de duración en ausencia o presencia de bortezomib a una concentración de 500nM. Cultivamos linfocitos T CD4+ mediante una separación inmunomagnética y el procedimiento se puede resumir de la siguiente manera:

➤ 1ª SEMANA:

- Estimulamos linfocitos T CD4+ con anti-CD3 adherido a la placa de cultivo y anti-CD28 soluble.
- Agregamos bortezomib 500nM a los pocillos correspondientes a partir de las primeras 48 horas cada 2 ó 3 días.

➤ 2ª SEMANA

- Repetimos la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28
- Mantuvimos el tratamiento con bortezomib a 500nM.
- Suplementamos el medio de todos los pocillos con IL-2 50U/mL cada 2 ó 3 días con el fin de mantener la viabilidad de los linfocitos T.

➤ 3ª SEMANA

- Ejecutamos los mismos pasos que en la segunda semana

➤ 4ª SEMANA

- No estimulamos con anti-CD3/anti-CD28 ni expusimos el cultivo al fármaco.
- Suplementamos el medio de todos los pocillos con IL-2 50U/mL.

Finalizadas las cuatro semanas de cultivo procedimos al estudio del fenotipo de los linfocitos.

El mismo procedimiento de cultivo y análisis de los linfocitos se llevó cabo a partir de una población de linfocitos T CD4+CD25-.

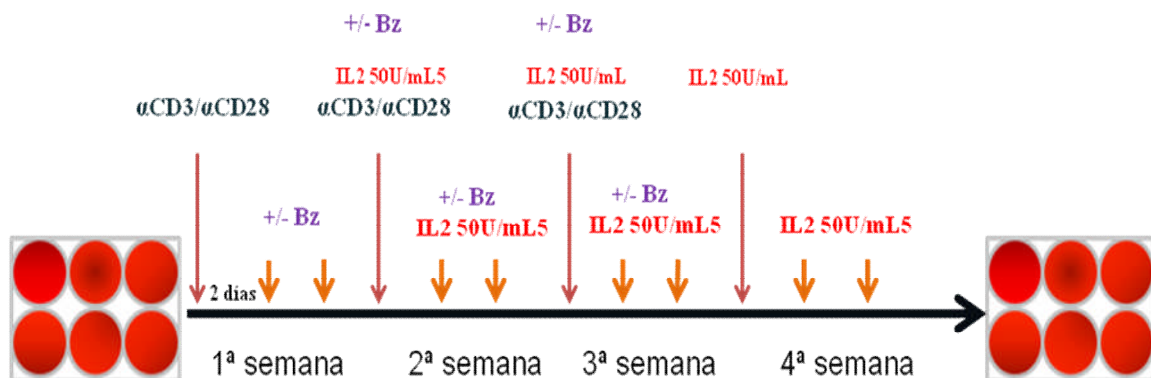


Fig 10: esquema del cultivo a largo plazo de linfocito T CD4+

4.2.2.3.1 Estudio del inmunofenotipo (CD25/CD127/CD4/FOXP3)

Una vez finalizadas las cuatro semanas de cultivo de los linfocitos T CD4+ y de los linfocitos T CD4+CD25- en las diferentes condiciones de cultivo, se hizo un estudio inmunofenotípico con el objetivo de averiguar las poblaciones celulares resultantes. La placa se centrifugó a 1200rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se recogieron las células en tubos de citometría. Las células se lavaron, se centrifugaron y se marcaron con los anticuerpos de membrana (CD25-FITC, CD127-PE y CD4-PerCPCy5.5.). Incubamos a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. Trascorrido este tiempo de incubación las células se lavaron de nuevo con PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en 1mL de Fixation/Permeabilization Buffer (25% fixation/permeabilization concentrate 75% de Fixation/Permeabilization Diluent). Incubamos a 4°C durante 30 minutos, lavamos en dos ocasiones con 2mL de 1X Permeabilization Buffer y resuspendimos en 100µl de 1X Permeabilization Buffer. En este momento añadimos el anticuerpo Foxp3-APC. Incubamos durante 30 minutos, a 4°C y oscuridad. Finalmente centrifugamos a 2000rpm durante 5 minutos resuspendimos en PBS y adquirimos la muestra en el citómetro de flujo.

4.2.2.3.2 Estudios de funcionalidad:

Para la realización de los estudios de funcionalidad se hicieron cultivos mixtos en placas de 48 pocillos en proporción 1:1 de linfocitos T CD4+ procedentes de los cultivos a largo plazo junto con células alogénicas activadas con anti-CD3/anti-CD28. El objetivo de este cultivo mixto era averiguar si estas células generadas a largo plazo eran capaces de suprimir la activación y proliferación de linfocitos T convencionales. Las condiciones del cultivo fueron las siguientes:

1. Control de células mononucleadas
2. Células mononucleadas activadas con anti-CD3/anti-CD28

3. Cocultivo de células mononucleadas y linfocitos T cultivados a largo plazo en ausencia de bortezomib
4. Cocultivo de células mononucleadas y linfocitos T cultivados a largo plazo expuestos a bortezomib a una concentración de 500nM

La fracción mononucleada, empleada en el cultivo, previamente se marcó con PKH-67 según se explica en el apartado 4.2.2.3.

Para los estudios de proliferación y seguimiento celular empleamos el colorante verde fluorescente, PKH67 (*kit MINI 67*) que contiene colas de carbono alifáticas que se incorporan a las regiones lipídicas de la membrana celular. De este modo si una célula se divide, las moléculas de PKH incorporadas a la membrana se reparten entre las células hijas siendo la pérdida de fluorescencia proporcional al grado de proliferación celular. La fluorescencia emitida por las células marcadas con PKH-67, se analiza por citometría de flujo en FL-1.

Tras cuatro días de cultivo, recogimos las células y procedimos a su estudio mediante citometría de flujo. Empleamos dos combinaciones de anticuerpos monoclonales:

- PKH/CD25/7-AAD/CD3
- PKH/IFN/CD3/CD40L

4.2.2.3.2.1 Estudio de proliferación linfocitaria: PKH/CD25/7-AAD/CD3

Recogimos las células mononucleadas con PBS en tubos de citometría y se incubaron con CD25-PE y CD3-APC durante 15 minutos en oscuridad. Después de lavar con PBS a 2000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en PBS. Se añadieron 5µL de 7-AAD e inmediatamente se adquirieron las células en el citómetro FACSCalibur. Se utilizó el programa Paint-A-Gate para el análisis del porcentaje de

células viables en proliferación de las diferentes subpoblaciones de los linfocitos T marcados con PKH:

- PKH+debilCD25+: linfocitos T activados en estado de proliferación
- PKH+intensoCD25+: linfocitos T activados no proliferantes
- PKH+intensoCD25-: linfocitos T en reposo

4.2.2.3.2.2. Activación linfocitaria: PKH/IFN/CD3/CD40L

Para poder valorar la producción de IFN y la expresión de CD40L añadimos Brefeldina A a cada una de las condiciones de las placas de 48 pocillos 6 horas antes del marcaje por citometría. Trascurrido este tiempo se recogieron las células en tubos de citometría. El marcaje de membrana se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 PerCP-Cy5.5. Incubamos durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Para el marcaje intracitoplasmático, utilizamos el kit Intrastain que permite fijar y permeabilizar la membrana celular, manteniendo intacta la estructura, morfología y superficie de las células. Para ello, después del marcaje de de membrana se añadieron 100µL de la solución A (fijador celular) al tubo de citometria durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. A continuación, lavamos con PBS a 2000 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se añadieron 100µL de la solución B para permeabilizar la membrana y añadir seguidamente los anticuerpos intracelulares: IFN- γ PE (3µL/pocillo) y CD40L APC (5µL/pocillo). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Tras lavar el exceso de anticuerpo, las células se re-suspendieron en 100µL de PBS para proceder a su adquisición en el citómetro de flujo.

4.2.2.4 Estudio de expresión génica de *FOXP3*

Para realizar los estudios de expresión génica de *FOXP3*, se extrajeron ARN total de los linfocitos T en estudio por medio del kit comercial de Qiagen AllPrep DNA/RNA microkit (Valencia CA, USA). Después, se realizó una retrotranscripción para obtener ADNcopia de las muestras, según el protocolo aprobado por el Programa de “Europe against Cancer” (177). La expresión del gen *FOXP3* se analizó por PCR cuantitativa utilizando ensayos comerciales (Hs01085835_m1 *FOXP3* y Hs00245445_m1 *ABLI* como gen control) en el equipo ABI PRISM 7900HT Sequence Detection. La expresión relativa de *FOXP3* se determinó según la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct_{FOXP3} - Ct_{ABLI}$.

4.2.3. Estudios in vitro de CDs tratadas con bortezomib

4.2.3.1. Generación de CDs

Las CDs son importantes reguladoras de la respuesta inmune celular. Las CDs mieloides, se pueden generar a partir de monocitos CD14 positivos. Esta población CD14 positiva se separó inmunomagnéticamente mediante un separador celular AutoMacs de la fracción mononucleada procedente de un concentrado leucoplaquetar.

Los monocitos resultantes de la separación inmunomagnética se mantuvieron en cultivo durante 7 días en placas de 48 pocillos a una concentración de 1×10^6 /mL. La diferenciación de las CDs se consiguió suplementando un medio de cultivo completo de RPMI con 1000 U/mL de GM-CSF y 1000 U/mL de IL-4. A estos cultivos se les cambió el medio los días 3 y 5. Con el objetivo de activar y madurar las CDs, el día 5 de cultivo adicionamos al medio TNF α 20ng/mL y LPS 1 μ g/mL. De modo que establecimos 2 grupos de CDs de estudio:

- CDs no estimuladas o inmaduras (cultivadas en RPMI + suero AB + 1000 U/mL de GM-CSF + 1000 U/mL de IL-4)

- CDs estimuladas o maduras (cultivadas en RPMI + suero AB + 1000 U/mL de GM-CSF + 1000 U/mL de IL-4 + TNF α 20 mg/mL + LPS 1 μ g/mL)

Analizamos el efecto del bortezomib en los dos grupos de CDs a estudio a dosis crecientes del fármaco. Las concentraciones empleadas estuvieron comprendidas entre 0nM (control) y 50nM. La droga se añadió desde el primer día de cultivo y se renovó en los correspondientes cambios de medio, a los días 3 y 5 de cultivo.

4.2.3.1.1. Análisis inmunofenotípico de CDs tratadas con bortezomib

Para evaluar inmunofenotípicamente las CDs hicimos estas cuatro combinaciones de anticuerpos monoclonales:

- CD3, CD56, CD14, CD19-FITC/CD40-PE/HLADR-PerCP-Cy5.5
- CD3, CD56, CD14, CD19-FITC/CD80-PE/HLADR-PerCP-Cy5.5
- CD3, CD56, CD14, CD19-FITC/CD83-PE/HLADR-PerCP-Cy5.5
- CD3, CD56, CD14, CD19-FITC/CD86-PE/HLADR-PerCP-Cy5.5

Estos tubos de citometría se montaron los días 3, 5 y 7 de cultivo con el fin de averiguar el momento de la diferenciación de los monocitos a CDs así como su grado de maduración. Para ello, las placas de 48 pocillos se colocaron en hielo durante 30 minutos y se recogieron las células con pipetas Pasteur y PBS frío en tubos de citometría. Las suspensiones celulares se marcaron con el panel de anticuerpos descrito anteriormente. Trascorridos los 15 minutos de incubación se lavaron, centrifugaron y se adquirieron las células en el citómetro FACSCalibur. Los eventos se analizaron en esta ocasión con el programa infonicyt 1.1.

4.2.3.1.2. Estudios de viabilidad de CDs tratadas con bortezomib

Para el análisis de la viabilidad celular de las CDs a los 7 días de cultivo empleamos el kit de Anexina-V, 7-amino-actinomicina-D, (7-AAD) de BD para citometría de flujo. Las placas de 48 pocillos se colocaron en hielo durante 30 minutos y se recogieron las células en tubos de citometría con PBS frío. Las células se marcaron y centrifugaron con la siguiente combinación de anticuerpos:

- CD3, CD56, CD14, CD19-FITC/Anexina-V-PE/7-AAD

El marcaje de este tubo de citmetría comenzó con el Kit de exclusión de CDs (CD3, CD14, CD19, CD56 en FITC). Incubamos 15 minutos, lavamos con PBS y resuspendimos las células en 100µL de Binding Buffer. En este momento transferimos las células marcadas a tubos *Trucount* para la cuantificación, en número absoluto, de células positivas anexina-V. Finalmente se añadieron 5µL de anexina-V-PE y 5µL de 7-AAD. Trascurridos 15 minutos de incubación se adquirieron las células en el citómetro de flujo FACSCalibur, empleando el programa CellQuest® y el análisis de las células viables se llevó a cabo con el programa Paint-A-Gate.

Se calculó el número (Nº) absoluto de eventos que expresan el marcador de apoptosis anexina V En base a la siguiete ecuación matemática

$$\frac{\text{Nº de eventos anexina V}}{\text{Nº absoluto de eventos}} \times \frac{\text{Nº de bolas de cada ensayo}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

4.2.3.1.3. Estudios de Western Blot

Mediante estudios por Western Blot se valoró los mecanismos implicados en la apoptosis inducida por el bortezomib a las CDs.

Con este fin evaluamos la expresión de la caspasa 3, caspasa 8 y la caspasa 9 a los 5 y 7 días de los cultivos de generación de CDs a partir de monocitos, estimuladas o no con TNF α o LPS y tratadas o no con bortezomib a 10 y 50nM.

Trascurridos los tiempos de cultivo, las placas se colocaron en hielo durante 30 minutos y se recogieron las células. Las células se lisaron en un volumen comprendido entre 250-400 μ L de tampón de lisis (140mM NaCl, 10mM EDTA, 10% glicerol, 1% nonident P-40, 20mM Tris (pH 8.0), 1mM pepstatina, 1 μ g/mL aprotinina, 1 μ g/mL leupeptina, 1mM PMSF, 1mM sodio ortovanadato) durante 5 minutos en hielo. Las células se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos y los sobrenadantes se transfirieron a tubos de microcentrífuga limpios. La cantidad de proteína de los sobrenadantes se cuantificó por el método de Bradford.

Para llevar a cabo el estudio, las proteínas fueron desnaturalizadas con tampón de carga de electroforesis 4X (8% SDS; 0,05% azul de Bromofenol; 40% glicerol y 200 mM Tris-HCl pH 6,8), calentándolas en un baño seco a 100°C durante 5 minutos.

Tras ser hervidas, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE preparados según Laemmli. El porcentaje de poliacrilamida fue variable dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas verticales aplicando un voltaje de 100-150V.

Los geles se transfirieron a membranas de PDVF en una solución de transferencia (Tris 25mM, glicina 192mM; metanol 10% v/v) aplicando un voltaje constante de 20V durante 14h. A continuación, las membranas se bloquearon durante una hora en agitación suave con solución de bloqueo (1 % albúmina de suero bovino y 0,05% azida sódica en solución de lavado de Western Blot (10mmol/L Tris, pH 7.5; 150mmol/L NaCl; 0,1 % Tween 20)). Tras ser bloqueadas, las membranas se incubaron, con los anticuerpos primarios anti-caspasa 3 de conejo (1:30000), anti-caspasa 8 (1:1000) y anti.caspasa 9 (1:1000) durante un periodo de 16 horas a 4°C. Seguidamente

se incubaron con sus pertinentes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con anticuerpo antiratón y anticonejo. Finalmente las bandas se visualizaron mediante la reacción de la peroxidasa potenciada por luminol y paraiodofenol sobre películas Fujifilm.

4.2.3.1.4. Determinación de la actividad de la enzima indolamina-2,3-dioxigenasa

La enzima indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) está implicada en el catabolismo del triptófano a quineurina. El triptófano es un aminoácido esencial, necesario para la proliferación linfocitaria. Las CDs pueden expresar actividad IDO con lo que pueden inducir una respuesta tolerogénica. Un método disponible para determinar la actividad de la enzima IDO es la relación entre quineurina y triptófano en el sobrenadante, de acuerdo con el protocolo de Alegre y col (178).

El estudio de la actividad de la enzima IDO se llevó a cabo en los cultivos de generación de CDs a partir de monocitos, estimuladas o no con $\text{TNF}\alpha$ y LPS, expuestas a dosis 0, 10 ó 50 nM de bortezomib. Se calculó la concentración de quineurina y triptófano en el sobrenadante de cada pocillo a los 3, 5 y 7 días de cultivo. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) equipado con una columna de agua C-18 de 150 mm de largo y 4.5 mm de diámetro interno. La fase móvil consistió en acetonitrilo (pH 4.0) y el detector se ajustó a una longitud de onda de 360 nm para la quineurina y 285 nm para el triptofano.

4.2.3.2. *Cocultivo linfocitos T y CDs*

Los linfocitos T se separaron inmunomagnéticamente a partir de células mononucleadas. Empleamos 2×10^6 de linfocitos T como células efectoras y CDs derivadas de monocitos (generadas según el apartado 4.2.3.1) como células estimuladoras en una proporción 5:1 en placas de 48 pocillos. Utilizamos para la activación de los linfocitos T, CDs maduras (con $\text{TNF}\alpha$ y LPS) y sin madurar en

presencia de bortezumib a 0, 10 ó 50nM. A los 4 u 8 días de cultivo los linfocitos T se reestimularon con CDs del mismo donante en este caso en una proporción de 10:1 y el medio se suplementó con IL-2 20U/mL para mantener la viabilidad de los linfocitos T. A los 3 días de cocultivo y a las 48 horas de la primera y segunda re-estimulación llevamos a cabo los estudios de citometría de flujo y ELISA con el fin de analizar la activación de las células efectoras y sus características.

4.2.3.2.1. Estudio inmunofenotípico de los linfocitos T efectores

El estudio inmunofenotípico de los linfocitos T efectores cocultivados con CDs se hizo a los tres días de los cocultivos y a las 48 horas después de las re-estimulaciones. Empleamos las siguientes combinaciones de anticuerpos:

- CD25-FITC/CD3-PE/CD4-PerCP-Cy5/CD40L-APC
- CD25-FITC/INF-PE/CD4-PerCP-Cy5/CD40L-APC

Para poder valorar la producción de IFN y la expresión de CD40L se añadió Brefeldina A 10µg/mL a los cultivos 6 horas antes del marcaje por citometría. De este modo se inhibe la secreción de citoquinas al sobrenadante durante ese periodo de tiempo de 6 horas.

La placa de 48 pocillos se colocó en hielo durante 30 minutos y se recogieron las células en tubos de citometría con pipetas Pasteur. Se centrifugaron los tubos y se añadieron los anticuerpos de membrana (CD25, CD3, CD4). Incubamos 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente añadimos 100µl de solución A del *Kit de permeabilización IntraStain*, a cada tubo y se incubaron durante otros 15 minutos en las mismas condiciones ambientales. Trascurrido este tiempo se lavaron las células con PBS y se centrifugaron a 2000rpm durante 5 minutos. Retiramos el sobrenadante y se añadió 100µl de la solución B del *Kit de permeabilización IntraStain*, y los anticuerpos intracitoplasmáticos (IFN-γ PE y CD40L APC). Las células se incubaron de

nuevo durante 15 minutos, se lavó el exceso de anticuerpo con PBS y se re-suspendió el precipitado celular en 100µl de PBS para la adquisición de los tubos en el citómetro de flujo (FACSCalibur). El análisis de los resultados se realizó mediante el programa infinicyt 1.1.

4.2.3.2.2. Determinación de IL-2, IFN α e IL-10 por medio de enzimoimmunoanálisis

En el mismo momento que se hicieron los estudios de citometría a los tres días del cocultivo y 48 horas después de las reestimulaciones se recogieron los sobrenadantes para la determinación de citoquinas IL2, IFN α e IL10. El test de enzimoimmunoanálisis (ELISA) se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, en la que una de las fases reaccionantes está inmovilizada en una superficie celular sólida. La unión antígeno-anticuerpo se revela mediante el uso de conjugados de tipo enzimático y la adición de un sustrato que produce color al reaccionar con la enzima. Todas las medidas se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (DIACLONE).

4.2.4 Estudios in vitro e in vivo del efecto sinérgico de bortezomib y sirolimus

4.2.4.1 Estudios de activación, viabilidad y proliferación linfocitaria in vitro con bortezomib y sirolimus

Los estudios de activación, viabilidad y proliferación celular se realizaron en placas de 96 pocillos con el fondo en U bajo dos condiciones de cultivo:

- Células control: 2×10^5 /200µl en cada pocillo
- Células estimuladas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL). 2×10^5 /200µl en cada pocillo

Los 2 tipos de cultivos se analizaron al cabo de 48 y 96 horas:

- en ausencia y presencia de bortezomib a distintas concentraciones (10, 100, 1000 y 10000nM),
- en ausencia y presencia de sirolimus a distintas concentraciones (0.05, 0.5, 5, 50, 500nM) o
- en presencia de la combinación de ambas drogas a las concentraciones seleccionadas (bortezomib a 100nM y sirolimus 0.5 ó 5nM).

4.2.4.1.1 Estudios de activación linfocitaria a las 48 horas de cultivo (CD25/IFN- γ /CD3/CD40L).

Para poder analizar la activación linfocitaria a las 48 horas, se añadió Brefeldina A 10 μ g/mL 6 horas antes del marcaje por citometría a todas las condiciones de cultivo.

Transcurridas las 6 horas, se centrifugó la placa de 96 pocillos a 1200 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. El marcaje de membrana se realizó con los anticuerpos monoclonales CD3 PerCP-Cy5.5 y CD25 FITC durante 15 minutos en la misma placa de cultivo, a temperatura ambiente y en oscuridad. Para el marcaje de antígenos intracelulares, se utilizó el kit Intrastain, por lo que se añadieron 100 μ L de la solución A (fijador celular) que se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. A continuación, se lavó con PBS a 2000 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante, se añadieron 100 μ L de la solución B y seguidamente los anticuerpos intracelulares: IFN- γ PE (3 μ L/pocillo) y CD40L APC (5 μ L/pocillo). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Tras lavar el exceso de anticuerpo, las células se re-suspendieron en 100 μ L de PBS para proceder a su adquisición en el citómetro de flujo FASCalibur empleando el programa informático CellQuest[®]. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Infinicyt 1.1.

4.2.4.1.2 Estudios de viabilidad celular a las 48 horas de cultivo (CD25/Anexina-V/7-AAD/CD3)

Para el análisis de la viabilidad celular empleamos el kit de Anexina-V, 7-amino-actinomicina-D, (7-AAD) de BD para citometría de flujo. La anexina V es un marcador de apoptosis, mientras que la 7AAD se une al ADN señalando así el fraccionamiento y muerte celular. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Una vez retirado el sobrenadante se añadieron 100µL de PBS a cada pocillo para resuspender las células y se recogieron en tubos de citometría. Las células mononucleadas se incubaron con CD25-FITC y CD3-APC durante 15 minutos. Después de lavar con PBS, centrifugamos a 1200 rpm durante 10 minutos, retiramos el sobrenadante y añadimos 100µL de Binding Buffer 1x. En este momento empleamos el kit de anexina/7AAD de BD y en cada tubo añadimos 5µL de anexina-V-PE y 5µL de 7-AAD. Incubamos 15 minutos y después de ese tiempo se agregaron 400µL de Binding Buffer 1x e inmediatamente se adquirieron las células en el citómetro de flujo FACSCalibur. Adquirimos un total de 30000 eventos, utilizando el programa informático CellQuest® y los eventos se analizaron mediante el programa: Infinicyt 1.1. Consideramos células viables los eventos Anexina y 7-AAD negativos.

4.2.4.1.3 Estudios de proliferación y viabilidad linfocitaria a las 96 horas de cultivo. (PKH/CD25/7-AAD/CD3).

Para los estudios de proliferación celular las células se marcaron con PKH tal y como se expone en el apartado 4.2.1.2. El PKH es útil para los estudios de proliferación así como para el seguimiento celular tanto *in vitro* como *in vivo*.

Cumplidas las 96 horas de cultivo, la placa se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante, resuspendimos las células en 100µl de PBS y adicionamos los anticuerpos monoclonales CD25 PE (5µL/pocillo) y CD3 APC

(3 μ L/pocillo). Se incubaron durante 15 minutos en oscuridad. Posteriormente, se centrifugó la placa y se lavaron todos los pocillos con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Tras retirar el sobrenadante, las células se resuspendieron y se recogieron con PBS en tubos de citometría debidamente rotulados donde se llevó a cabo el marcaje con la 7-AAD (5 μ L/tubo). Inmediatamente después los eventos se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el programa informático CellQuest[®]. El análisis de los eventos se llevó a cabo mediante el programa PAINT-A-GATE-PRO[™] con el que se seleccionó la población CD3 positiva y 7-AAD negativa para posteriormente, con el programa ModFit LT for Mac analizar la proliferación celular en base a la pérdida de intensidad del marcador verde fluorescente PKH. También pudimos analizar la viabilidad celular evaluando el porcentaje de eventos 7-AAD negativos, mediante el programa InFinicyt 1.1.

4.2.4.2 Estudio de citoquinas solubles.

Para poder realizar el análisis de las citoquinas solubles partimos de 100 μ l de sobrenadante obtenidos de cultivos de linfocitos T estimulados con anti-CD3/anti-CD28 durante 48 horas, tratados con:

- sirolimus: concentración 0,5 o 5nM
- Bortezomib: 100nM
- sirolimus 0,5 o 5nM y bortezomib 100nM

En el estudio se empleó el Kit comercial BD[™] Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, que nos permitió estimar la cantidad de las citoquinas solubles: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ presente en el sobrenadante.

El protocolo de preparación se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En primer lugar, reconstituimos el estándar liofilizado con 2ml de Assay Diluent. A partir del estándar preparamos diluciones seriadas de concentraciones

conocidas, de manera que podemos establecer una recta patrón. A continuación, se preparó la mezcla de las esferas de captura para cada una de las citoquinas a determinar. Cada uno de los tipos de esferas emite una fluorescencia de diferente intensidad que se detecta en FL3, lo que nos permite realizar un análisis simultáneo de las seis citoquinas solubles.

Una vez preparados todos los reactivos necesarios, se mezclaron 50µL de las esferas de captura, 50µL de cada una de las diluciones estándar o 25µL de la muestra problema y 50µL del anticuerpo de detección (conjugado en PE). Incubamos durante 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se añadió 1mL de Wash Buffer y centrifugamos a 200g durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y re-suspendimos en 300µL de Wash Buffer. Adquirimos en un citómetro FACSCalibur, utilizando el programa BDCellQuest software. El análisis de datos se desarrolla con el programa BD CBA Software.

4.2.4.3 Estudios Western Blot en Linfocitos T

Nos planteamos los estudios de Western Blot para valorar las vías implicadas en la activación y proliferación de los linfocitos T, tales como pAkt y pErk.

Realizamos cultivos de una concentración de 1×10^6 células/mL de la línea celular T Jurkat en RPMI complementado con suero bovino fetal y antibiótico en placas de 6 pocillos y estimuladas con anti-CD3(5µg/ml)/anti-CD28 (2.5µg/ml). Se establecen las siguientes condiciones de cultivo incubados a 48 horas:

1. Células Jurkat control
2. Células Jurkat estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 en ausencia de las drogas
3. Células Jurkat estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 en presencia de las drogas
 - a. Bortezomib 100nM

b. Sirolimus 5nM

c. Bortezomib 100nM más sirolimus 5nM

Para llevar a cabo el estudio, las células se procesaron de la misma manera que hemos expuesto en el punto 4.2.3.6. Únicamente señalar que los anticuerpos primarios empleados fueron anti-pAkt de conejo (1:500), anti-pErk de ratón (1:500) y anti- α tubulina.

4.2.4.4 *Modelo murino de EICH*

Para la generación de EICH murino empleamos como donantes ratones machos de entre 8 -10 semanas de la cepa C57BL/6 con haplotipo H2^b y como receptores ratones hembras de entre 8-10 semanas de la cepa BALB/c con haplotipo H2^d. De esta manera se consigue un modelo de incompatibilidad HLA para generar EICH comparable a la que sucede en humanos. Mediante citometría de flujo, es posible la identificación de las células procedentes tanto del donante como del receptor en los ratones trasplantados, debido a la existencia de anticuerpos monoclonales específicos para cada cepa de ratón. De este modo se puede conocer el quimerismo a diferentes tiempos post-trasplante.

Se analizaron los efectos de los diferentes fármacos por separado o la combinación de sirolimus y bortezomib o sirolimus y CsA, sobre la aparición de EICH y la supervivencia de cada grupo experimental.

4.2.4.4.1 Células empleadas en el trasplante

En el modelo de trasplante alogénico murino utilizamos:

- MO procedente de los fémures y las tibias de los ratones donantes. Se introdujo RPMI a presión por el canal medular de los huesos usando agujas de 25G (0,5 x 16mm). La solución celular resultante se hizo pasar

a través de filtros de 40µm de poro. Después del lavado de las células se procedió a un recuento celular mediante una cámara de Neubauer.

- Células maduras del bazo del ratón donante, fundamentales para la generación de EICH en el ratón receptor. El bazo se disgregó mecánicamente con dos portas esmerilados. El producto obtenido se filtró a través de un filtro de 40µm de poro y de la misma manera que con la MO tras el lavado de las células se determinó el número de células de las que disponíamos.

Las dos soluciones celulares se resuspendieron de modo que a cada ratón receptor se le inyectó 5×10^6 células de MO asociado o no a 5 ó 10×10^6 células del bazo en 300µl de RPMI.

4.2.4.4.2 Fármacos

- El bortezomib se infundió por vía intravenosa a una dosis de 1µg/ratón en un volumen de 200µl de RPMI los días 0, +1 y +2 post-trasplante.
- El sirolimus se administró por vía intra-peritoneal a una dosis de 0.25mg/Kg de peso por ratón en un volumen de 200µl de suero fisiológico los días del 0 a +12 post-trasplante.
- La CsA se suministró por vía intraperitoneal a una dosis de 10 a 15mg/Kg por ratón en un volumen de 200µl de suero fisiológico los días 0 a +12 post-trasplante.

4.2.4.4.3 Irradiación

El proceso de irradiación se llevó a cabo empleando una fuente de Cesio 137, mediante un irradiador de muestras biológicas Gammacell 1000 que consta de dos partes:

- un contenedor fijo de la fuente radiactiva encapsulada en plomo
- un rotor que contiene un canister donde se introducen los ratones y cuya base rotatoria permite una exposición homogénea de la muestra a la fuente.

Los ratones receptores se sometieron a una irradiación corporal letal de 850cGy dividida en dos fracciones de 425cGy separadas por 4 horas.

4.2.4.4.4 Trasplante

Dos horas después de la segunda irradiación procedimos al trasplante de los ratones receptores. El ratón receptor se inmoviliza en una jaula donde con una bombilla infrarroja de calor conseguimos dilatar las venas laterales de su cola. Inmediatamente después administramos con una jeringa TERUMO MYJECTOR de 0,5mL y una aguja montada de 27x1/2"-0,4x12mm una infusión de 5×10^6 células de MO asociado o no a $5 \text{ ó } 10 \times 10^6$ esplenocitos de ratones donadores en 300µl de RPMI.

4.2.4.4.5 Experimentos murinos

Los ratones receptores después de ser irradiados se estabularon en jaulas estériles con cobertor en aisladores de aire filtrado y presión positiva.

Todos los ratones de cada jaula recibieron el mismo tratamiento y se valoró individualmente dos veces a la semana la variación del peso así como la aparición de otros signos de EICH (postura, actividad, erizamiento del pelo e integridad de piel) empleando una escala de 0-2 (CITA).

4.2.4.4.5.1 Modelo murino de EICH en el que valoramos el efecto sinérgico de bortezomib y sirolimus

Con objeto de valorar el posible efecto sinérgico de bortezomib y sirolimus en modelos murinos con EICH, trabajamos con 6 grupos experimentales. Cada uno de los cuales estaba compuesto por 5 ratones y el experimento se repitió un mínimo de 2 veces por grupo.

1. *TBI* (total body irradiation): Control de irradiación.
2. *MO*: Control de MO (infusión de 5×10^6 células de MO).
3. *EICH*: Control de EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + 5 ó 10×10^6 esplenocitos).
4. *EICH+Bz*: Tratamiento con Bortezomib del EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + $5/10 \times 10^6$ esplenocitos+ Bortezomib $1 \mu\text{g}/\text{ratón}$ a 10nM en $200 \mu\text{l}$ iv los días 0, +1 y +2 postrasplante).
5. *EICH+sirolimus*: Tratamiento con sirolimus del EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + $5/10 \times 10^6$ esplenocitos + sirolimus $0.25 \text{mg}/\text{Kg}/\text{ratón}$ en $200 \mu\text{l}$ ip los días 0 a +12 postrasplante).
6. *EICH+Bz+sirolimus*: Tratamiento con Bortezomib y sirolimus del EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + $5/10 \times 10^6$ esplenocitos + Bortezomib $1 \mu\text{g}/\text{ratón}$ a 10nM en $200 \mu\text{l}$ iv los días 0, +1 y +2 post-trasplante + sirolimus $0.25 \text{mg}/\text{Kg}/\text{ratón}$ en $200 \mu\text{l}$ ip los días 0 a +12 post-trasplante).

Grupo	850cGy	MO 5×10^6	BAZO $5/10 \times 10^6$	Bortezomib $1 \mu\text{g}/\text{ratón}$	Sirolimus $0.25 \text{mg}/\text{Kg}$
1. TBI	SI	-	-	-	-
2. MO	SI	SI	-	-	-
3. EICH	SI	SI	SI	-	-
4. EICH+Bz	SI	SI	SI	SI	-
5. EICH+Sirolimus	SI	SI	SI	-	SI
6. EICH+Bz+Sirolimus	SI	SI	SI	SI	SI

Tabla 4: grupos de tratamiento del modelo de ratón realizados, con el fin de evaluar el efecto sinérgico de bortezomib y sirolimus

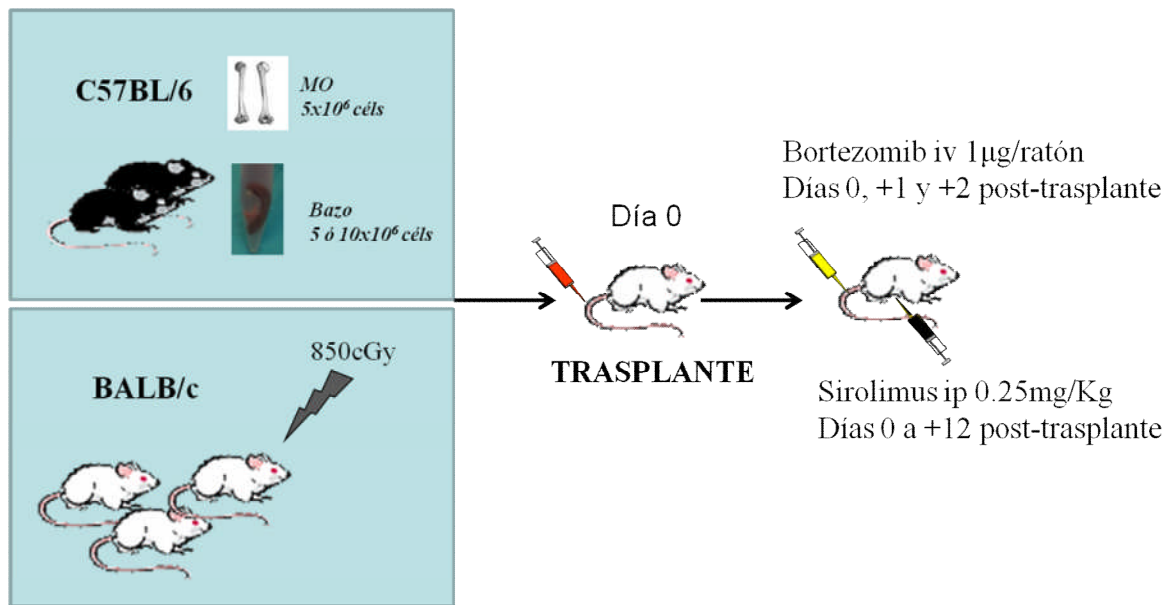


Fig 11: modelo murino de EICH empleando como profilaxis el efecto sinérgico de bortezomib y sirolimus.

4.2.4.4.5.2 Modelo murino de EICH con el que valoramos el efecto sinérgico de CsA y sirolimus

Con el propósito de valorar el efecto sinérgico de CsA y sirolimus, trabajamos con 6 grupos experimentales. Cada uno de ellos estaba compuesto por 5 ratones y el experimento se repitió como mínimo 2 veces por grupo.

1. *TBI* (total body irradiation): Control de irradiación.
2. *MO*: Control de MO (infusión de 5×10^6)
3. *EICH*: Control de EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + 10×10^6 células de bazo).
4. *EICH+CsA*: Tratamiento con CsA del EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + 10×10^6 células de bazo + CsA $10\text{-}15 \text{ mg}/\text{Kg}$ ratón en $200 \mu\text{l}$ ip los días 0 a +12 post-trasplante).

5. *EICH+sirolimus*: Tratamiento con sirolimus del EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + 10×10^6 células de bazo + sirolimus 0.25mg/Kg/ratón en 200 μ l ip los días 0 a +12 postrasplante).
6. *EICH+CsA+sirolimus*: Tratamiento con CsA y sirolimus del EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + 10×10^6 células de bazo + CsA 10 a 10mg/Kg/ratón en 200 μ l ip los días 0 a +12 post-trasplante + sirolimus 0.25mg/Kg/ratón en 200 μ l ip los días 0 a +12 post-trasplante).

Grupo	850cGy	MO 5×10^6	BAZO $5/10 \times 10^6$	CsA 10-15mg/Kg	Sirolimus 0.25mg/Kg
1. TBI	SI	-	-	-	-
2. MO	SI	SI	-	-	-
3. EICH	SI	SI	SI	-	-
4. EICH+CsA	SI	SI	SI	SI	-
5. EICH+Sirolimus	SI	SI	SI	-	SI
6. EICH+CsA+Sirol.	SI	SI	SI	SI	SI

Tabla 5: grupos de tratamiento del modelo de ratón realizados con el fin de evaluar el efecto sinérgico de CsA y sirolimus

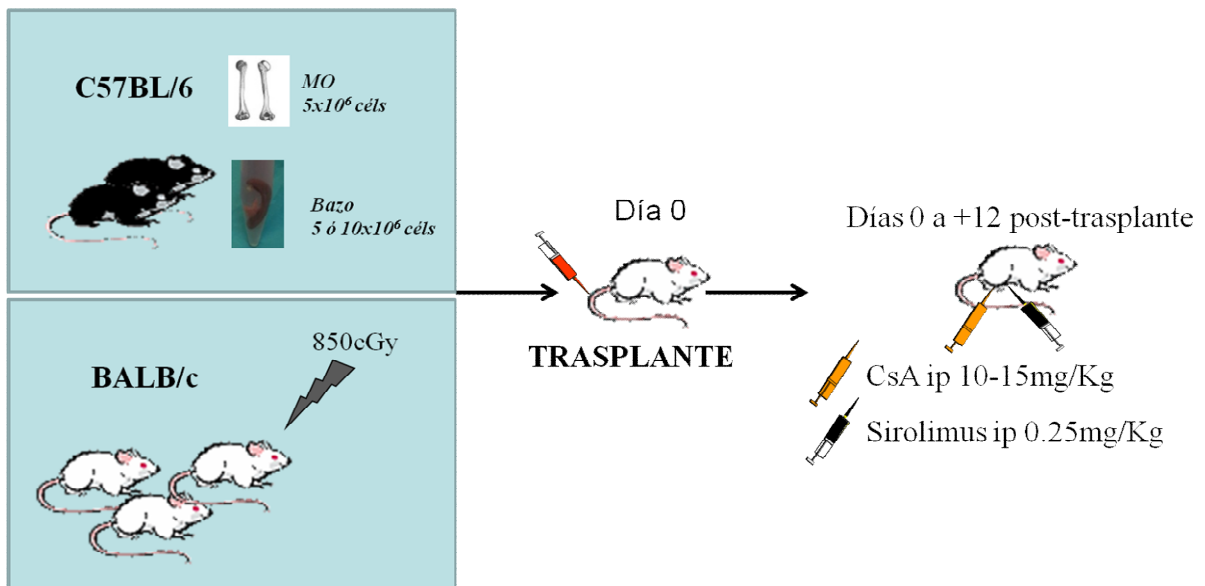


Fig 12: modelo murino de EICH empleando como profilaxis el efecto sinérgico de CsA y sirolimus.

4.2.4.4.5.3 Modelo murino de EICH para la evaluación de la respuesta inmune frente a otros antígenos

En este modelo experimental empleamos como donantes a ratones BALB/c que previamente habían sido trasplantados con MO y esplenocitos de C57BL/6 y habían recibido como profilaxis de EICH bortezomib y sirolimus (ratones pertenecientes al grupo 6 del apartado 4.2.4.7.5.1.) y no habían desarrollado EICH en el día +40. Como receptores empleamos ratones NOD/SCID que fueron irradiados subletalmente con 300 cGy. Trabajamos con dos grupos experimentales de ratones NOD/SCID:

1. Grupo MO de NOD/SCID: recibían por vía iv 5×10^6 de MO
2. Grupo EICH de NOD/SCID: recibían por vía iv 5×10^6 de MO y 5×10^6 esplenocitos.

Grupo	300cGy	MO de BALB/c	BAZO de BALB/c
NODSCID		5x10⁶	5x10⁶
1. MO	SI	SI	-
2. EICH	SI	SI	SI

Tabla 6: grupos de tratamiento del modelo de ratón utilizado para valorar la respuesta inmune frente a otros antígenos

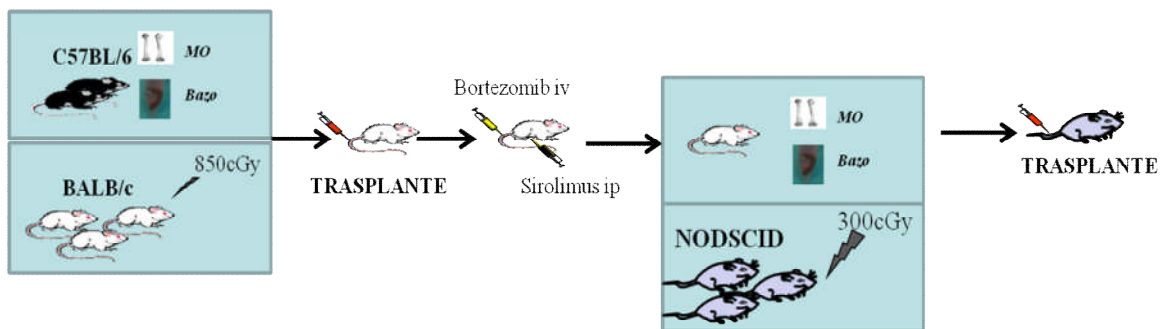


Fig 13: modelo murino de respuesta inmune frente a otros antígenos

4.2.4.4.5.4 Modelo murino de EICH para la evaluación del efecto del injerto contra tumor

En este modelo experimental empleamos ratones C57BL/6 como donante y ratones BALB/c que se irradian letalmente con 850cGy. Se establecieron dos grupos experimentales un control trasplantado con MO y célula WEHI 3b d+ clon 17.3 GFP+ detectable en FL-1 por citometria de flujo y un grupo al que se generó EICH y se le administró células WEHI 3b d+ clon 17.3 GFP+:

1. grupo MO + WEHI: recibieron 5×10^6 de MO de C57BL/6 y 4×10^4 células WEHI
2. grupo EICH tratado con Bortezomib y sirolimus + WEHI: se les administró 5×10^6 de MO y 5×10^6 esplenocitos de C57BL/6 junto con

4×10^4 células WEHI y como profilaxis de EICH bortezomib $1 \mu\text{g}/\text{ratón}$ por vía iv los días 0 a +2 post-trasplante y sirolimus $0.25\text{mg}/\text{Kg}/\text{ratón}$ por vía ip los días 0 a +12 post-trasplante.

Grupo	850c	MO	BAZO	WEHI	Bz+S
	Gy	5×10^6	5×10^6	4×10^4	
1. MO +WEHI	SI	SI	-	-	-
2. EICH +Bz +S+ WEHI	SI	SI	SI	SI	SI

Tabla 7: grupos de tratamiento del modelo de ratón llevado a cabo para comprobar el efecto de injerto contra tumor

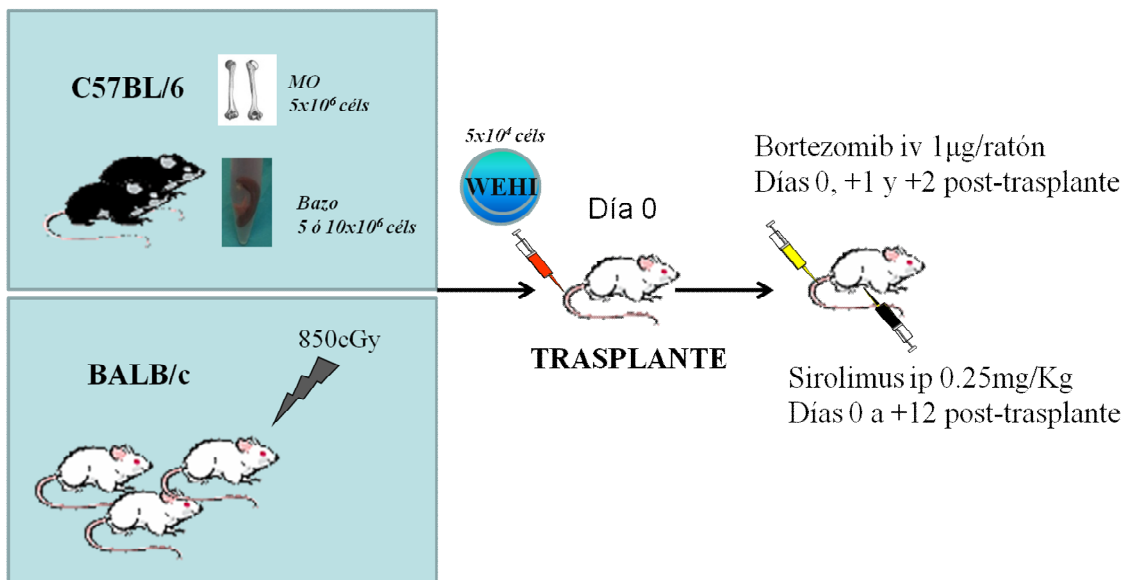


Fig 14: Modelo murino realizado con el objetivo de comprobar el efecto del injerto contra tumor

4.2.4.4.6 Análisis por citometría de flujo

Con objeto de analizar el momento del quimerismo, la evolución del trasplante así como evaluar por separado los efectos de los fármacos empleados de forma individual o combinados, se sacrificaron ratones a diferentes días post-trasplante y se analizó mediante citometría de flujo la sangre periférica, la MO y el bazo.

El panel utilizado fue el siguiente:

- H2Db-FITC/H2Dd-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD34-Alexafluor
- H2Db-FITC/H2Dd-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD3-Alexafluor

4.2.5 Análisis estadístico.

Se calcularon la media y desviación estándar y la mediana y el rango para cada variable. Para evaluar el efecto de los fármacos sobre las distintas variables analizadas se empleó el test ANOVA o la T de student para datos pareados.

La supervivencia de los ratones en el modelo de EICH fue calculada desde el día del trasplante hasta la muerte por cualquier causa usando la estimación de Kaplan-Meier.

Para la comparación entre las curvas de evolución de los signos de EICH de los ratones post-trasplante se empleó el test de modelo general de medidas repetidas.

Para la mayoría de los análisis estadísticos se usó el programa SPSS software program (SPSS 11.0 Inc. Chicago IL. USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 CAPITULO UNO: BORTEZOMIB Y LOS LINFOCITOS T REGULADORES

Nuestro grupo ha demostrado previamente que el bortezomib elimina de manera selectiva los linfocitos T alorreactivos, preservando aquellos linfocitos T no activados. Esta propiedad es fundamental para establecer el uso del bortezomib en el contexto del trasplante alogénico para la prevención de la EICH. En este sentido los linfocitos Treg están implicados en el control de la EICH y nos hemos propuesto determinar el efecto que ejerce el bortezomib sobre esta subpoblación. Para ello, llevamos a cabo cultivos con linfocitos T CD4⁺ convencionales o reguladores (CD4⁺CD25⁺), separados por bolas inmunomagnéticas. Observamos que los linfocitos Treg con fenotipo CD4⁺CD25⁺ eran resistentes al efecto pro-apoptótico del bortezomib. Una vez establecida la resistencia de los Treg a la acción del bortezomib, se cultivaron linfocitos T CD4⁺ activados con anti-CD3/anti-CD28 durante cuatro semanas en presencia de IL-2 y bortezomib a una concentración de 500nM para averiguar si este fármaco era capaz de dar lugar a una población enriquecida en linfocitos Treg *in vitro*. A pesar de no aumentar el número de linfocitos Treg de forma significativa, en cocultivos con otras células mononucleadas alogénicas, estos linfocitos T CD4⁺ cultivados a largo plazo en presencia de bortezomib fueron capaces de disminuir la proliferación, la producción de IFN γ y la expresión de CD40L de otros linfocitos T alogénicos.

En términos globales, nuestros resultados respaldarían el uso de bortezomib en la prevención de la EICH, así como en otras enfermedades mediadas por células T debido a su gran capacidad para preservar y generar linfocitos con funciones supresoras.

Treatment with bortezomib of human CD4⁺ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct suppressor T-cell population

Belén Blanco, José A. Pérez-Simón, Luis I. Sánchez-Abarca, Teresa Caballero-Velazquez, Silvia Gutierrez-Cossío, Pilar Hernández-Campo, María Díez-Campelo, Carmen Herrero-Sanchez, Concepción Rodríguez-Serrano, Carlos Santamaría, Fermín M. Sánchez-Guijo, Consuelo del Cañizo, and Jesús F. San Miguel

Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca and Centro de Investigación del Cáncer (CIC/CSIC) Salamanca, Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia celular de Castilla y León, Spain

Funding: José A Pérez-Simón was supported by a fellowship from the European Hematology Association; Belén Blanco was supported by a fellowship from the Fondo de Investigación Sanitaria.

Manuscript received on December 20, 2008. *Revised version arrived on* February 9, 2009. *Manuscript accepted on* February 23, 2009.

Correspondence:
José A Pérez Simón,
Servicio de Hematología y CIC
Salamanca, Paseo de San
Vicente, s/n 37007,
Salamanca, Spain.
E-mail: pesimo@usal.es

The online version of this article contains a supplementary appendix.

ABSTRACT

Background

In vitro depletion of alloreactive T cells using the proteasome inhibitor bortezomib is a promising approach to prevent graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. We have previously described the ability of bortezomib to selectively eliminate alloreactive T cells in a mixed leukocyte culture, preserving non-activated T cells. Due to the role of regulatory T cells in the control of graft versus host disease, in the current manuscript we have analyzed the effect of bortezomib in regulatory T cells.

Design and Methods

Conventional or regulatory CD4⁺ T cells were isolated with immunomagnetic microbeads based on the expression of CD4 and CD25. The effect of bortezomib on T-cell viability was analyzed by flow cytometry using 7-amino-actinomycin D staining. To investigate the possibility of obtaining an enriched regulatory T-cell population *in vitro* with the use of bortezomib, CD4⁺ T cells were cultured during four weeks in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, IL-2 and bortezomib. The phenotype of these long-term cultured cells was studied, analyzing the expression of CD25, CD127 and FOXP3 by flow cytometry, and mRNA levels were determined by RT-PCR. Their suppressive capacity was assessed in co-culture experiments, analyzing proliferation and IFN- γ and CD40L expression of stimulated responder T cells by flow cytometry.

Results

We observed that naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are resistant to the pro-apoptotic effect of bortezomib. Furthermore, we found that long-term culture of CD4⁺ T cells in the presence of bortezomib promotes the emergence of a regulatory T-cell population that significantly inhibits proliferation, IFN- γ production and CD40L expression among stimulated effector T cells.

Conclusions

These results reinforce the proposal of using bortezomib in the prevention of graft versus host disease and, moreover, in the generation of regulatory T-cell populations, that could be used in the treatment of multiple T-cell mediated diseases.

Key words: bortezomib, regulatory T cells, graft-versus-host disease, prevention.

Citation: Blanco B, Pérez-Simón JA, Sánchez-Abarca LI, Caballero-Velazquez T, Gutierrez-Cossío S, Hernández-Campo P, Díez-Campelo M, Herrero-Sanchez C, Rodríguez-Serrano C, Santamaría C, Sánchez-Guijo FM, del Cañizo C, and San Miguel JF. Treatment with bortezomib of human CD4⁺ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct suppressor T-cell population. *Haematologica* 2009;94:975-983. doi:10.3324/haematol.2008.005047

©2009 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

The ability of regulatory T (Treg) cells of suppressing immune responses has raised a deep interest for their potential therapeutic use in T-cell mediated diseases, including autoimmune disorders, allograft rejection or graft-versus-host disease (GVHD). Different Treg-cell subsets have been described.¹ The best studied are naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T (nTreg) cells. nTreg cells develop in the thymus and then migrate to the periphery, where they play a key role in self-tolerance.² Phenotypically, they are characterized by the constitutive expression of high levels of CD25 (IL-2 receptor α chain),² the transcription factor forkhead box P3 (FOXP3)³ and other markers such as GITR (glucocorticoid induced TNF receptor family-related protein)⁴ CD62L⁵ or CTLA-4.⁶ They also express low levels or no CD127.⁷ However, none of these markers is uniquely associated with nTreg cells and activated conventional T cells acquire a very similar phenotype.⁸ Therefore, it is difficult to obtain pure nTreg populations without activated non-regulatory T-cell contamination.

Several experimental protocols have been described for the extrathymic generation of suppressor T cells. These adaptive or inducible regulatory T (iTreg) cells can be generated in the periphery *in vivo* under various tolerogenic conditions, such as oral tolerance induction⁹ or injection of tolerogenic dendritic cells.¹⁰ *In vitro*, repetitive stimulation with immature dendritic cells^{11,12} or the presence of suppressive cytokines such as IL-10¹³ or TGF- β in the culture¹⁴ can induce iTreg cells. It is also possible to generate or expand Treg cells *ex vivo* by treating T cells with pharmacological immunosuppressants such as vitamin D3 and dexamethasone^{15,16} or rapamycin, which has been reported to promote selective expansion of naturally occurring Treg cells.¹⁷

We have previously shown that the proteasome inhibitor bortezomib selectively induces apoptosis of activated T cells while preserving viability of resting T cells.¹⁸ This property turns bortezomib into a potential therapeutic tool against GVHD, raising the possibility of *in vitro* purging alloreactive T cells while preserving effector T cells with other specificities. Due to the suggested importance of nTreg cells in the control of GVHD,¹⁹⁻²² in the current manuscript we have analyzed the effect of bortezomib on nTreg-cell viability. Our results demonstrate that the addition of bortezomib to activated CD4⁺ T-cell cultures allows survival of nTreg cells and, moreover, promotes the emergence of a distinct suppressor CD4⁺ T-cell population (bTreg) that strongly inhibits the activation of *in vitro* stimulated T cells.

Design and Methods

Cell purification and culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats of volunteer healthy donors by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque solution (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). All donors provided written informed consent in accordance with the

Declaration of Helsinki. CD4⁺ T cells were purified by negative selection using the Untouched CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Isolation of CD4⁺CD25⁺ T cells was performed by using the CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). To obtain the CD4⁺CD25⁺ population, CD25⁺ cells were depleted from isolated CD4⁺ T cells using CD25 Microbeads (Miltenyi Biotec). All the magnetic separations were performed with the Automacs™ Separator, following the manufacturer's instructions. The purity of isolated populations was routinely >95%. Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine 2 mM, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 mg/mL (all from GIBCO, Grand Island, NY, USA) and 10% human AB serum (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Viability assays

CD4⁺CD25⁺ T cells were isolated from CD4⁺ T cells. CD4⁺CD25⁺ cells were then stained with the green fluorescent dye PKH-67 (Sigma) following the manufacturer's instructions and mixed back with CD4⁺CD25⁺ PKH⁻ T cells. The cells were then cultured in the absence of any stimulus or stimulated with either allogeneic irradiated (15 Gy) PBMCs or with plate bound anti-CD3 (10 μ g/mL) and soluble anti-CD28 (1 μ g/mL) mAbs (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Different concentrations (0, 100, 500 or 1000 nM) of bortezomib (kindly provided by Millenium Pharmaceuticals Inc, Cambridge, MA, USA) were added to every culture condition. After five days of culture, cells were collected, stained with CD25-PE, 7 amino-actinomycin D (7-AAD) and CD4-APC (all from BD Biosciences), and acquired in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Paint-A-Gate software was used to calculate the percentage of viable cells (7-AAD⁻) in every subpopulation: regulatory T cells (PKH⁺CD25⁺), resting conventional T cells (PKH⁺CD25⁻) and activated conventional T cells (PKH⁻CD25⁺).

In another set of experiments, CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells were isolated and separately stimulated for five days with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Different concentrations (0, 100, 500 or 1000nM) of bortezomib were added to every culture condition. Viability of each subpopulation was analyzed by flow cytometry as described above.

CD4⁺ T-cell long-term culture and immunophenotypic analysis

Purified total CD4⁺ or CD4⁺CD25⁺ T cells were stimulated with plate bound anti-CD3 (10 μ g/mL) and soluble anti-CD28 (1 μ g/mL) mAbs (BD Biosciences). After 48 h, medium or bortezomib 500 nM was added. Three rounds of stimulation of seven days each were performed. IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was added starting from the second round of stimulation at 50 U/mL. IL-2 and medium/bortezomib were added every two or three days. Cells were left resting for one more week in the presence of IL-2, but in the absence of anti-CD3/anti-CD28 and bortezomib. After four weeks of culture, cells were collected and stained with CD25-FITC/CD127-PE-/CD4-PerCP-Cy5.5/FOXP3-APC antibodies (all from BD Biosciences, except FOXP3 from eBiosciences, San Diego, CA, USA). Briefly, for surface staining, 100 μ l of sample per tube were

Bortezomib allows the selective growth of regulatory T cells

incubated with the corresponding monoclonal antibodies for 15 min at room temperature in the dark. Cells were washed in PBS and then fixed and permeabilized with FoxP3 Staining Buffer Set (eBiosciences) for FOXP3 staining.

Quantification of FOXP3 mRNA expression

Total RNA was obtained from T cells using the QiaGen AllPrep DNA/RNA Microkit (Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed as previously described.²³ FOXP3 RNA levels were quantified using the 7900 HT Fast Real-Time PCR System and TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The assay IDs were: *ABL1*, Hs00245445_m1, and *FOXP3*, Hs01085835_m1. The cycle number at which the reaction crossed an arbitrarily placed threshold (Ct) was determined and the relative expression of *FOXP3* regarding *ABL1* was described using the equation $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta C_t = Ct_{FOXP3} - Ct_{ABL1}$.²⁴

Functional studies: suppression assays

PBMCs from healthy donors were stained with PKH-67 and stimulated with plate bound anti-CD3 (10 µg/mL) and soluble anti-CD28 (1 µg/mL) mAbs. CD4⁺ T cells cultured during four weeks as previously described were added at a 1:1 responder cells:long-term cultured cells ratio. After four days, cells were collected, stained with CD25-PE, 7-AAD and CD3-APC mAbs and analyzed by flow cytometry. Paint-A-Gate software was used to calculate the percentage of proliferating activated T cells (PKH^{int}CD25⁺), non-divided activated T cells (PKH^{int}CD25⁻) and non-activated T cells (PKH^{int}CD25⁻) among viable responder T cells. ModFit software was also used to calculate the percentage of resting and proliferating cells.

CD40L and IFN-γ production of responder and long-term cultured CD4⁺ T cells were also analyzed by flow cytometry after staining with CD25-FITC/IFN-γ-PE/CD4-PerCP-Cy5.5/CD40L-APC. The IntraStain kit (Dako Cytomation, Denmark) was used following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Mean values and their SD as well as the median and range were calculated for each variable using the SPSS software program (SPSS 15.0, Chicago, IL, USA). Comparison between groups was made by analysis of variance (*post hoc* Scheffé and Tukey tests were performed to confirm differences between groups). A two-way Measurement of Repeated Multiple Analysis (MR-MANOVA two ways) was performed to compare the effect of the different doses of the drug within the different types of culture. *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results**Bortezomib does not affect CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell viability**

To investigate whether bortezomib affects nTreg cell viability, we isolated CD4⁺ T cells and subsequently sepa-

rated the CD4⁺CD25⁺ nTreg cell population. As conventional activated T cells showed a similar phenotype to nTreg cells after *in vitro* expansion (*data not shown*), we stained CD4⁺CD25⁺ T cells with the green fluorescent dye PKH-67 to specifically identify nTreg cells after culture, and mixed them again with CD4⁺CD25⁻ (PKH-67⁻) cells. We cultured CD4⁺ T cells in the absence of stimulus (control) or stimulated either with allogeneic leukocytes (mixed leukocyte culture, MLC) or with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies. Different concentrations of bortezomib (0, 100, 500, 1000 nM) were added to each culture condition. Five days later, we analyzed by flow cytometry the viability of the different types of CD4⁺ T cells: regulatory (CD25⁺ PKH⁺), resting conventional (CD25⁻ PKH⁺) and activated conventional (CD25⁺ PKH⁻) T cells, assessed by the percentage of 7AAD⁻ cells of each subpopulation (*Online Supplementary Figure S1*).

In un-stimulated samples, neither viability of regulatory nor conventional T cells was affected. As previously shown by our group,¹⁸ when stimulated in MLC, or with anti-CD3/anti-CD28 antibodies, viability of activated T cells decreased in a dose-dependent manner, whereas resting T cell viability barely changed with the addition of bortezomib. Interestingly, viability of regulatory T cells in stimulated cultures remained essentially constant at the different doses of bortezomib (Figure 1A).

In addition, nTreg cells were selected based on the expression of CD25 as previously specified and the effect of the drug was evaluated on isolated non-Treg versus nTreg cells. Again, nTreg cells were not significantly affected in terms of viability by increasing the doses of the drug (Figure 1B).

It is worth mentioning that the phenotypic characteristics of isolated CD4⁺CD25⁺ T cells were analyzed by flow cytometry (*Online Supplementary Figure S2*), confirming that they showed the typical phenotype of naturally occurring regulatory T cells: CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127^{-low}.

Long-term culture of CD4⁺ T cells in the presence of bortezomib gives rise to a regulatory T-cell population

Since bortezomib did not affect nTreg cell viability, we next investigated whether we could obtain a purified regulatory T-cell population after long-term culture of CD4⁺ T cells in the presence of bortezomib, as has been described with other immunosuppressants. For this purpose, we cultured CD4⁺ T cells for three weeks with anti-CD3/anti-CD28 and exogenously added IL-2, in the presence or in the absence of 500nM bortezomib, and one more week in the presence of IL-2, but in the absence of stimulus or bortezomib. At the end of the culture we analyzed the phenotypic characteristics of these cells. As shown in Figure 2A, bortezomib induced a significant increase of CD25 expression ($p < 0.001$), although no significant differences were observed by flow cytometry in the expression of FOXP3 or CD127 between untreated and bortezomib-treated cells. However, RT-PCR analysis showed a significant increase of FOXP3 RNA levels in cells long-term cultured in the presence of 500nM bortezomib. Nevertheless, this FOXP3 mRNA level was much lower as compared to naturally occurring nTreg (Figure 2B). A more detailed analysis (shown in Figure 3A) of these long-term cultured

B. Blanco et al.

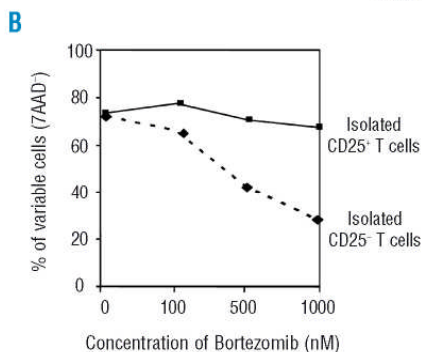
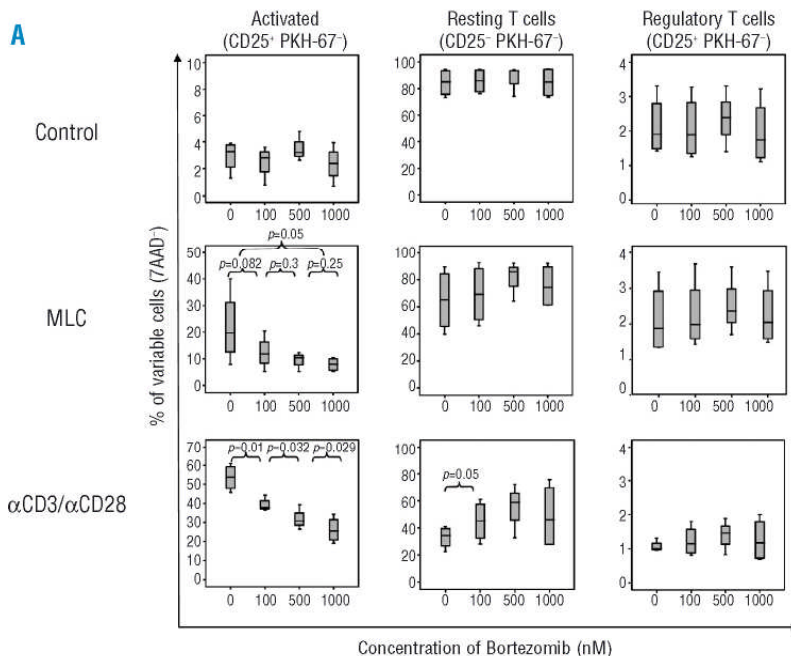


Figure 1. (A) High doses of bortezomib (1000 nM) did not decrease viability among Treg cells (PKH-67⁺CD25⁺ population) or resting T cells (PKH-67⁺CD25⁻ population) in either un-stimulated (control), MLC or α CD3/ α CD28 stimulated CD4⁺ T-cell cultures. Conversely, percentages of viable activated T cells (PKH-67⁺CD25⁻ population) significantly decreased in a dose dependent manner in stimulated cultures. (B) Viability of isolated CD4⁺CD25⁺ cells versus CD4⁺CD25⁻ cells after exposure to increasing concentrations of bortezomib.

cells showed that at least three subpopulations of CD4⁺ T cells appeared: 1) a CD25⁻FOXP3⁻CD127⁺ population; 2) a CD25⁺FOXP3⁺CD127⁺ population and 3) a CD25⁺FOXP3⁻CD127⁻ population. Interestingly, we found that in those cultures performed with the drug, the percentage of CD25⁻ T cells significantly decreased, while both the CD25⁺FOXP3⁺CD127⁺ and the CD25⁺FOXP3⁻CD127⁻ populations significantly increased (Figure 3A and B).

Next, we investigated whether these bortezomib long-term cultured T cells showed suppressive capacity using functional assays. For this purpose, freshly isolated PKH-67 stained T cells (responder T cells) were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the absence of bortezomib and co-cultured with CD4⁺ T cells long-term cultured with or without the drug (Online Supplementary Figure S3). As controls, responder T cells were cultured alone, either unstimulated or stimulated with anti-CD3/anti-CD28. After four days, we analyzed the prolifer-

ation and activation of responder T cells. The expression of CD25 slightly decreased in responder T cells co-incubated with bortezomib-treated cells. However, the number of proliferating cells, as assessed by PKH fluorescence diminution, significantly decreased when co-incubated with cells previously treated for three weeks with high doses of bortezomib (Figure 4A and B). Escalating ratios of long-term cultured:effector T cells were performed in order to evaluate the suppressive capacity of these cells. Freshly isolated CD4⁺CD25⁺ nTreg cells were used as controls. Results are shown in Figure 4C. We also analyzed IFN- γ production and CD40L expression by both responder and long-term cultured populations in these suppression assays. The percentage of IFN- γ positive responder T cells significantly decreased when stimulated in the presence of 500nM bortezomib-treated cells, compared to responder cells co-incubated with bortezomib-untreated T cells (Online Supplementary Figure S4). Regarding the long-term cultured populations, 60.9% of the cells cultured in the absence of bortezomib were IFN- γ positive, versus 8% among T cells treated with 500nM bortezomib. Likewise, CD40L positive cells decreased from 48.9% for untreated cells to 21.56% for bortezomib-treated cells (Figure 5).

Bortezomib allows the selective growth of regulatory T cells

A regulatory T-cell population can also be obtained after long-term culture of CD4⁺CD25⁻ T cells in the presence of bortezomib

These results suggested that long-term culture of CD4⁺ T cells in the presence of bortezomib increases the percentage of naturally occurring CD4⁺CD25⁻ regulatory T cells but, most importantly, gives rise to a distinct population of suppressor or regulatory T lymphocytes (bTreg) (CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ cells). In order to confirm that this bTreg population was not derived from CD4⁺CD25⁺

nTreg cells, but a different Treg population, we used the same approach starting the experiment from CD4⁺ T cells depleted of CD25⁺ Treg cells. Upon analyzing the different T-cell populations obtained after culture, again a significant decrease of the CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ population was observed, while the percentage of CD25⁺FOXP3⁺CD127⁺ cells (bTreg) significantly increased. Likewise, a significant increase in the CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ cells was observed (Figure 6A and B).

Functional assays were again performed in order to eval-

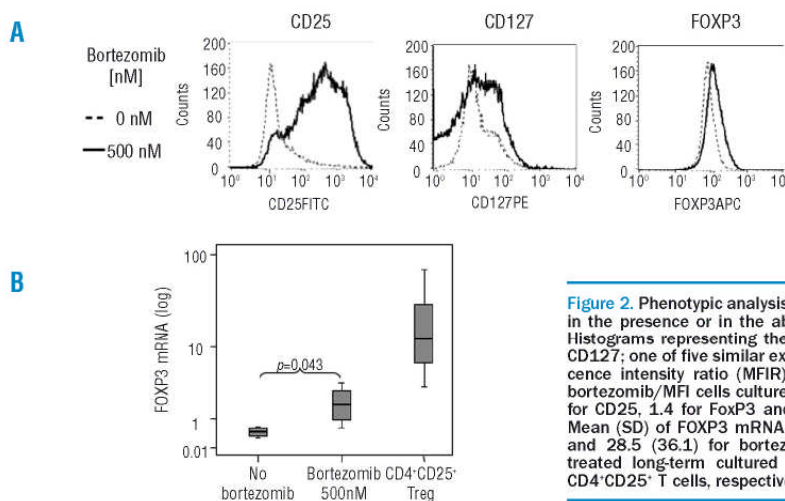


Figure 2. Phenotypic analysis of long-term cultured CD4⁺ T cells in the presence or in the absence of 500nM bortezomib. (A) Histograms representing the expression of CD25, FOXP3 and CD127; one of five similar experiments is shown. Mean fluorescence intensity ratio (MFIR) (MFI cells cultured with 500nM bortezomib/MFI cells cultured with 0nM bortezomib) were 4.9 for CD25, 1.4 for FoxP3 and 0.95 for CD127 expression. (B) Mean (SD) of FOXP3 mRNA level was 0.45 (0.17), 1.95 (1.1) and 28.5 (36.1) for bortezomib untreated and bortezomib treated long-term cultured T cells, and for freshly isolated CD4⁺CD25⁺ T cells, respectively.

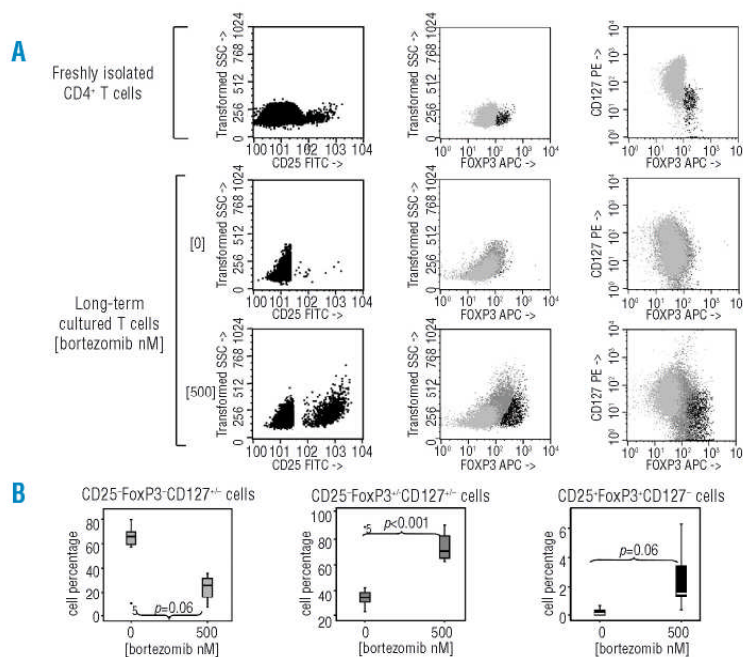


Figure 3 CD4⁺ T-cell sub-populations obtained after long-term culture in the presence of bortezomib. (A) Immunophenotypic analysis allowed the identification of CD25⁺FOXP3⁺CD127⁻ cells, CD25⁺FOXP3⁺CD127⁺ cells and CD25⁺FOXP3⁻CD127⁻ cells among freshly isolated or long-term cultured (bortezomib 0 or 500 nM) CD4⁺ T cells. One representative experiment of five is presented. (B) Percentages of each of the three subpopulations obtained after CD4⁺ T-cell long-term culture in the presence or in the absence of bortezomib 500 nM.

B. Blanco et al.

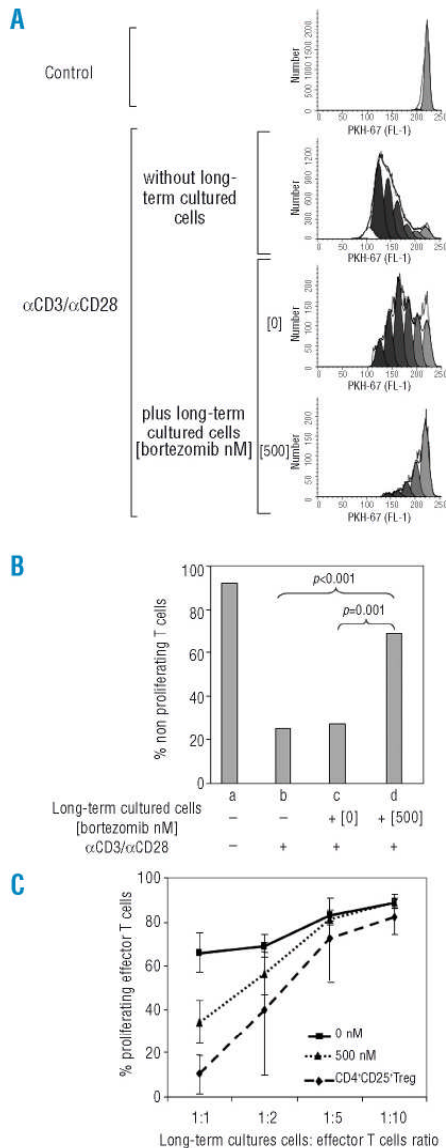


Figure 4. Suppression assays: proliferation. (A) proliferation, monitored by PKH-67 dilution of control or α CD3/ α CD28 stimulated responder T cells, co-incubated or not with cells long-term cultured in the presence or in the absence of 500 nM bortezomib (1:1 ratio); one of five similar experiments is shown. (B) Mean (SD) number of non-proliferating cells among responding T lymphocytes were 92 (18.3), 25 (8.4), 27.3 (7.3), and 68.7 (9.6) for (a) unstimulated T cells (negative control), (b) T cells stimulated with α CD3/ α CD28 (positive control) and T cells incubated with α CD3/ α CD28 plus T lymphocytes long-term cultured (c) without bortezomib or (d) with 500nM bortezomib. (C) Titration assays showing the suppressive capacity of T cells long-term cultured at 500nM bortezomib (bTreg) at increasing ratios of long-term cultured versus effector T cells. Naturally occurring CD4⁺CD25⁺ Treg as well as CD4⁺ T cells long-term cultured in the absence of bortezomib (shown as 0nM) were used as controls.

uate the suppressive effect of long-term cultured CD4⁺CD25⁺ cells on the proliferation of responder T cells. Interestingly, as shown in Figure 6C, T cells long-term cultured in the presence of bortezomib significantly decreased the proliferation of responder T cells, the mean percentage (SD) of resting cells among responding T lymphocytes being 17.9% (5.9) versus 72% (9.3) upon culture with untreated versus bortezomib-treated T lymphocytes ($p < 0.001$). Thus, bTreg with suppressive capacity were also obtained after culture of CD4⁺CD25⁺ selected T cells in the presence of bortezomib.

Finally, we compared percentage of the three subpopulations obtained after long-term culture of total CD4⁺ cells versus CD4⁺CD25⁺ selected T cells. Although there were no statistically significant differences, long-term cultured total CD4⁺ T cells showed a higher percentage of bTreg and nTreg cells than CD4⁺CD25⁺ cells (*data not shown*). Upon comparing functional effect of both type of cells, those bTreg obtained after culture of total CD4⁺ cells displayed a higher suppressive effect, although these differences were not statistically significant, the mean percentage (SD) of non-proliferating effector T cells in suppression assays being 78.5 (8.9) versus 72 (9.3) for responder T cells co-cultured with total CD4⁺ or CD4⁺CD25⁺ T cells, respectively, $p = 0.27$.

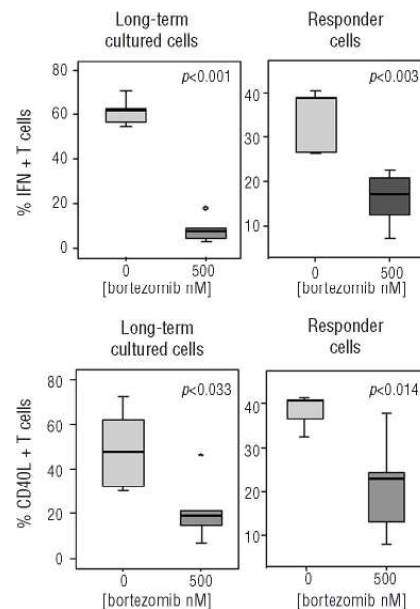


Figure 5. Suppression assays: IFN- γ and CD40L intracytoplasmic production after co-culture of responder plus long-term cultured T cells; expression by both responder and long-term cultured T cells is shown.

Bortezomib allows the selective growth of regulatory T cells

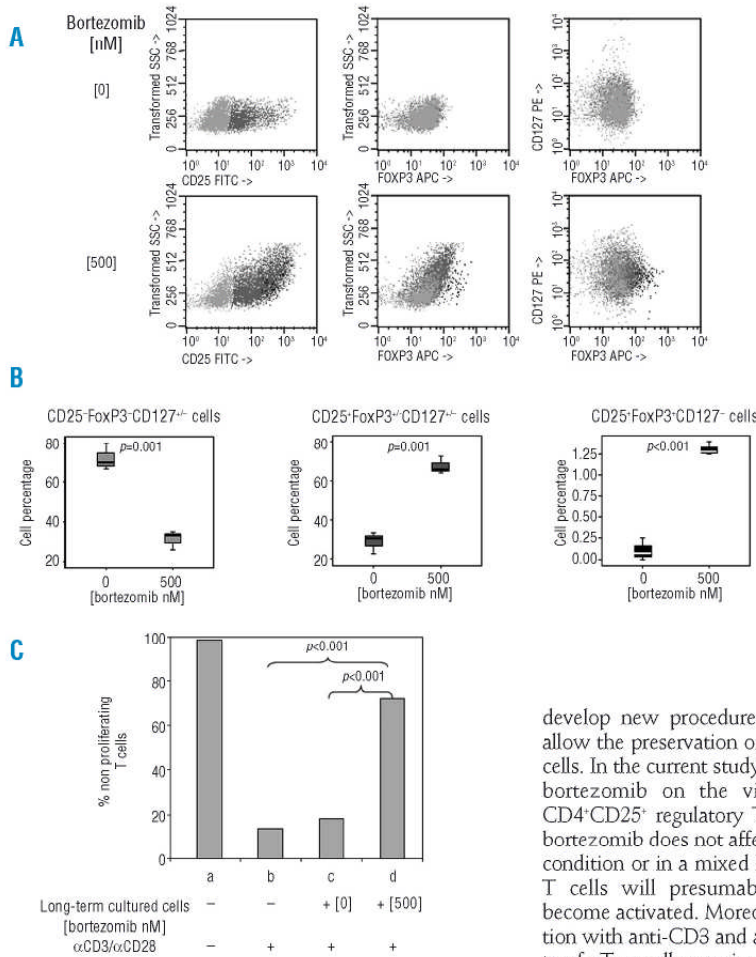


Figure 6. Analysis of long-term cultured CD4⁺CD25⁺ T cells in the presence or in the absence of 500 nM bortezomib. (A) Dot plots representing the subpopulations obtained; one of five similar experiments is shown. (B) Box-plots showing cell percentages of the three subpopulations obtained: CD25⁻FOXP3⁻CD127^{+/-}, CD25⁻FOXP3⁺CD127^{+/-} and CD25⁻FOXP3⁺CD127⁻. (C) Suppression of proliferation of responder T cells by long-term cultured CD4⁺CD25⁺ T cells. The mean (SD) number of non-proliferating cells among responding T lymphocytes was 98.4 (0.7), 13.4 (1.63), 17.9 (5.9), and 72 (9.3) for (a) un-stimulated T cells (negative control), (b) T cells stimulated with αCD3/αCD28 (positive control) and T cells incubated with αCD3/αCD28 plus (c) untreated versus (d) 500nM bortezomib-treated long-term cultured T lymphocytes.

develop new procedures of GVHD prophylaxis which allow the preservation or even expansion of regulatory T cells. In the current study we have addressed the effect of bortezomib on the viability of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Our results indicate that bortezomib does not affect nTreg viability, both in resting condition or in a mixed leukocyte culture in which some T cells will presumably recognize alloantigens and become activated. Moreover, even after polyclonal activation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, the viability of nTreg cells remained unaffected.

On the other hand, the resistance of nTreg cells to the pro-apoptotic effect of bortezomib prompted us to explore the possibility of obtaining a cell population highly enriched on regulatory T cells using bortezomib, as previously reported with immunosuppressive drugs such as the combination vitamin D3-dexamethasone or rapamycin.¹⁵⁻¹⁷ For that purpose, we stimulated CD4⁺ T cells for three weeks in the presence or in the absence of bortezomib, and left them resting one more week in the absence of the drug. The analysis of CD4⁺ T cells at the end of the culture reveals the existence of at least three subpopulations: a CD25⁻FOXP3⁻CD127^{+/-} population, most likely cells that have returned to the resting state; a CD25⁻FoxP3⁺CD127⁻ population, presumably naturally occurring Treg cells and a CD25⁻FoxP3^{+/-} population (bTreg), expressing variable levels of CD127. The nTreg cell population significantly augmented with the addition of bortezomib, although the percentage remained rather modest. These data suggest that treatment with bortezomib, even during long periods of time and at high doses, preserves Treg cells but does not promote a great expansion of this cell subset. Nevertheless, the analysis of the

Discussion

We have previously proposed the use of the proteasome inhibitor bortezomib for *in vitro* depletion of alloreactive T cells in order to prevent GVHD. To this extent, we have demonstrated that, in a mixed leukocyte culture, bortezomib selectively kills alloreactive T cells.¹⁸ Moreover, preliminary data using this approach in the clinical setting have already been reported showing promising results.²⁵ But another important issue remained to be considered. Accumulating evidence suggests an important role of Treg cells in the control of GVHD. Several studies have found a positive correlation between high numbers of circulating CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg cells and reduced GVHD^{22,26,27} after hematopoietic stem cell transplantation. Likewise, it has been suggested that approaches of selective depletion of alloreactive T cells based on CD25⁺ T-cell depletion could exacerbate GVHD due to the elimination of CD4⁺CD25⁺ Treg cells.²⁸ Thus, it would be desirable to

B. Blanco et al.

suppressive capacity of this long-term cultured CD4⁺ cells showed that T cells cultured in the presence of bortezomib significantly reduced the proliferation, IFN- γ production and CD40L expression of anti-CD3/anti-CD28 stimulated responder T cells, while the addition of bortezomib-untreated cells to the cultures barely changed these parameters among responder T cells. It's unlikely that this marked suppressor effect is only due to the modest increase in the percentage of nTreg cells, but most probably to the CD25⁺FOXP3⁺ (bTreg) population which significantly increases upon culture with high doses of bortezomib.

In order to confirm that this suppressor effect was mainly due to a population different from nTreg, either selected or generated by the treatment with bortezomib, we studied if we could obtain the same suppressor population starting from CD4⁺CD25⁻ T cells. With this aim, we performed similar experiments with CD4⁺ T cells depleted of nTreg cells. Interestingly, for all the parameters analyzed, we obtained similar results to those achieved when the starting population contained nTreg cells. It is of note that small percentages of cells with nTreg phenotype appeared in Treg depleted cells cultured with bortezomib. These cells may correspond to contaminating Treg cells that remained after CD25⁻ T-cell depletion (<0.5%) the percentage of which has increased because of their proliferative advantage over conventional T cells in the presence of bortezomib. Likewise, bortezomib long-term cultured cells, both total CD4⁺ or CD4⁺CD25⁻ cells, showed a marked reduced production of IFN- γ , and significantly lower expression of CD40L, while FOXP3 expression did not reach the levels observed among nTreg cells. Interestingly, it has been demonstrated that FOXP3 may not be essential for the function of *ex vivo* generated regulatory T cells, as FOXP3⁻ Treg cells induced by several approaches have been shown to efficiently inhibit proliferation of T cells similarly to CD4⁺CD25⁺ nTreg cells.^{11,16} Therefore, on one hand, the culture of CD4⁺ T cells in the presence of bortezomib does not affect nTreg cell viability and, on the other hand, long-term culture of CD4⁺ T cells in the presence of bortezomib, irrespective of whether they contain CD25⁺ T cells or not, gives rise to a regulatory population, apparently different from naturally occurring Treg cells. Both properties may be of clinical relevance, not only for the treatment of GVHD, but also for situations in which activation of T cells is undesirable, such as autoimmune disorders or solid organ transplantation. Pre-clinical studies have clearly shown protection of GVHD after nTreg cells transfer in murine models of bone marrow transplantation.²⁹⁻³¹ The inconvenience of this approach is

that the nTreg population represents a small percentage of peripheral blood CD4⁺ T cells (5-10%) so that expansion procedures are required. This expansion can be achieved by polyclonal stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of IL-2. However, these culture conditions are highly favorable for the expansion of conventional T cells, which can contaminate the purified nTreg-cell population and overgrow nTreg after prolonged culturing *in vitro*.³² As it has been pointed out,³³ the risk of co-expanding potentially harmful cells represents a major concern for the clinical use of expanded nTreg cells. In order to minimize this problem, Battaglia *et al.* have proposed the addition of rapamycin to the culture media, resulting in a significant reduction of the undesired expansion of effector T cells and allowing the proliferation of nTreg cells.¹⁷ In a similar way, we have found that bortezomib reduces the expansion of conventional T cells, allowing both the survival of naturally occurring nTreg cells and the appearance of a distinct suppressor T-cell population, limiting the expansion of undesired effector T cells. In this regard, our results resemble more those obtained by Valmori *et al.*, who postulate that rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4⁺ T-cell cultures is not due to the selective expansion of nTreg cells, but to the induction of regulatory functions in conventional CD4⁺ T cells.³⁴ Accordingly, our treatment gives rise to a population of suppressor T cells which differ from nTreg cells. But whether these cells were committed or not to be regulatory, that is, if they are selected or newly induced with this approach, should be addressed.

In summary, the promising results obtained in this study strengthen our idea of using bortezomib in the prevention of GVHD, not only because of its selective cytotoxic effect on activated T cells, but also due to its ability to preserve and/or generate regulatory T cells.

Authorship and Disclosures

BB performed data analysis and wrote the manuscript; JAP-S designed the research project; LIS-A performed viability assays; TC-V performed functional assays; SG-C performed Treg expansion; PH-C performed functional assays; MD-C performed cytometry assays; ST performed viability assays; CR-S performed Treg expansion; CS performed molecular studies; FMS-G critically reviewed the manuscript; CdC critically reviewed the manuscript; JSM supervised the research project.

The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Jiang S, Lechler RI, He XS, Huang JF. Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Hum Immunol* 2006; 67:765-76.
- 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.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-23.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3:135-42.
- Read S, Malmstrom V, Powrie F.

Bortezomib allows the selective growth of regulatory T cells

- Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.
7. Cozzo C, Larkin J, III, Caton AJ. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171:5678-82.
 8. Gregori S, Bacchetta R, Hauben E, Battaglia M, Roncarolo MG. Regulatory T cells: prospective for clinical application in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2005;12:451-6.
 9. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265:1237-40.
 10. Li M, Zhang X, Zheng X, Lian D, Zhang ZX, Sun H, et al. Tolerogenic dendritic cells transferring hyporesponsiveness and synergizing T regulatory cells in transplant tolerance. *Int Immunol* 2008;20:285-93.
 11. Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 2005;105:1162-9.
 12. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192:1213-22.
 13. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737-42.
 14. 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.
 15. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002;195:603-16.
 16. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, et al. 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* 2004;172:5986-93.
 17. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2006;177:3338-47.
 18. Blanco B, Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca LI, Carvajal-Vergara X, Mateos J, Vidriales B, et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* 2006;107:3575-83.
 19. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144-50.
 20. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99:3493-9.
 21. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GVHD. *Blood* 2006;107:1717-23.
 22. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903-11.
 23. Santamaria C, Chillon MC, Fernandez C, Martin-Jimenez P, Balanzategui A, Garcia SR, et al. Using quantification of the PML-RAR α transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2007;92:315-22.
 24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(- $\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
 25. Koreth J, Kim HT, Ho VT, Cutler CS, Soiffer RJ, Antin JH, et al. Bortezomib plus tacrolimus/methotrexate for prophylaxis of acute GVHD after HLA mismatched allogeneic non-myeloablative transplantation: results of a dose finding phase I study. *Biology of Blood and Bone Marrow Transplantation* 2008; suppl # 140.
 26. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC, et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004;104:2187-93.
 27. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilich J, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 2006;108:1291-7.
 28. Martin PJ, Pei J, Gooley T, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg J, et al. Evaluation of a CD25-specific immunotoxin for prevention of graft-versus-host disease after unrelated marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:552-60.
 29. Hanash AM, Levy RB. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2005;105:1828-36.
 30. Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* 2004;103:4216-21.
 31. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389-99.
 32. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, et al. Human CD25+ CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002;196:1335-46.
 33. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol* 2007;7:585-98.
 34. Valmori D, Tosello V, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Wang Y, et al. Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells. *J Immunol* 2006;177:944-9.

5.2 CAPITULO DOS: BORTEZOMIB Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las CD_s son una pieza clave en la regulación del sistema inmune. NF- κ B ejerce un papel fundamental en la maduración y activación de las CD_s. Por lo tanto, un inhibidor del proteosoma como el bortezomib que en ultimo termino bloquea NF- κ B podría generar una respuesta tolerogénica en los linfocitos T que entran en contacto con estas CD_s tratadas.

En este capítulo nos propusimos evaluar el efecto del bortezomib tanto en la viabilidad de las CD_s como en la maduración de las mismas. Las CD_s maduras o no se generaron a partir de cultivos de monocitos y se cultivaron en ausencia o presencia de bortezomib a diferentes concentraciones. Pudimos confirmar que a 50nM el bortezomib dañaba a las CD_s afectando su viabilidad. De hecho a concentraciones más bajas disminuía la expresión de moléculas coestimuladoras tales como CD83, CD86 o CD40. Estas CD_s tratadas y cocultivadas con linfocitos T alogénicos no estimulaban de forma correcta a estos linfocitos T. Más aún, favorecían en los linfocitos T la expresión de Foxp3 y la producción de IL-10 mientras que disminuía el IFN α . Cuando estos linfocitos T cocultivados con CD_s tratadas con bortezomib se reestimulaban nuevamente con CD_s del mismo donante no tratadas no se activaban correctamente.

En este segundo capitulo ponemos de manifiesto que el bortezomib afecta tanto a la viabilidad como a la maduración de las CD_s, lo cual favorece la generación de una respuesta tolerogénica entre los linfocitos T alogénicos que entran en contacto con estas CPAg. Esta característica del bortezomib podría respaldar su utilización en el contexto del trasplante alogénico.

Bortezomib induces apoptosis and modifies the maturation pattern of dendritic cells.

Sánchez-Abarca LI, Caballero-Velázquez T, Blanco B, Díez-Campelo M, Gutierrez-Cosío S, Gutiérrez NC, Herrero C, Carrancio S, Martín-Jiménez P, González A, Cañizo C, San Miguel JF, Pérez-Simón JA

Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Salamanca y Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca; Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León; Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain,

Abstract

NF- κ B family is a key transducer of inflammatory signals involved in DC maturation and survival. We evaluated the effect of bortezomib, a proteasome inhibitor which blocks NF- κ B activation, in both DC' viability and maturation as well as the ability of bortezomib-treated DC to generate a tolerogenic T-cell response. Bortezomib hampered viability at 50nM. At lower doses, bortezomib decreased the expression of several costimulatory molecules such as CD83, CD86 or CD40. Bortezomib-treated DC had an impaired ability to stimulate alloreactive T lymphocytes. Moreover, after mixed lymphocyte reaction with bortezomib-treated DC, T lymphocytes overexpressed FoxP3 and produced significantly higher levels of IL-10 and lower IFN α . Interestingly, T lymphocytes previously cultured with bortezomib-treated DC remained unactivated upon re-exposure to untreated mature DC from the same donor. In conclusion, bortezomib affects both DC viability and activation which in turn favours a tolerogenic response among allogeneic T lymphocytes.

Introduction:

Graft versus host disease represents a major challenge after allogeneic stem cell transplantation, which results from the immune attack of donor T cells to recipient tissues including skin, liver or gut, among other target organs. T cells are initially primed by professional antigen-presenting cells; particularly, dendritic cells (DC) are specialized for antigen uptake and presentation to naïve T cells(1). In the transplant setting, this is the main mechanism to induce activation, expansion and maturation of the T cells with an antigen receptor that can recognize a host-derived peptide antigen bound to MHC molecules and, for this reason, DC play a crucial role in the development of both acute and chronic GVHD(2,3).

In the steady state, DC are essential for the self / non-self distinction process. Although central tolerance is efficient, it is also incomplete and some self-reactive T cells can escape negative selection. Accordingly, peripheral mechanisms of tolerance are required to maintain immunologic self tolerance(4). This function is exerted by certain subsets of DC and particularly those displaying an immature phenotype. The regulatory functions of DC include the induction of T-cell anergy and T-

cells with regulatory properties(5). Immature DC express low levels of MHC and costimulatory molecules. Thus, they do not provide the two signals required for efficient T-cell activation and, in the absence of costimulation, T-cell become anergic. By contrast, the proinflammatory milieu generated in the context of allogeneic stem cell transplantation by the extensive damage induced in host tissues favours DC maturation(6), characterized by the overexpression of costimulatory and adhesion molecules such as B7.1 and B7.2. These modifications increase the T cell priming ability of DC(1,4,5).

These properties make DC a potential candidate for the induction of immunotolerance(7) and, accordingly, several strategies have been postulated to deplete host DC, in order to avoid host derived peptide antigen presentation(8) or to keep DC at an immature state(9-13).

NF- κ B is a collective term referring to dimeric transcription factors that belong to the Rel family, which are regulated via shuttling from the cytoplasm to the nucleus in response to cell stimulation(14,15). The NF- κ B family has emerged as a key transducer of inflammatory signals involved in dendritic cell maturation and

T lymphocyte activation (16,17). Thus, stimulation of Toll-like receptors (TLR) by ligands such as lipopolysaccharide (LPS) or CpG-containing DNA from bacteria or viruses induce DC maturation through different pathways which finally leads to

NF- κ B activation(18,19). Moreover, NF- κ B activates multiple target genes whose products can inhibit apoptosis and both anti-apoptotic activity and immunogenic response are intimately linked (20,21).

Bortezomib, a boronic acid dipeptide is a potent, selective and reversible inhibitor of the proteasome. The proteasome is a multi-enzyme complex present in every cell. It degrades proteins that regulate cell-cycle progression and causes proteolysis of the ubiquitinated endogenous inhibitor of nuclear factor- κ B, I κ B(22,23). The latter blocks the nuclear translocation and transcriptional activity of NF- κ B. Bortezomib has shown cytotoxicity against a broad range of human tumor cells which constitutively express NF- κ B activity(23) as well as against alloreactive or activated T cells, as we have previously shown(24). In the current manuscript we have analyzed the effect of bortezomib in both DC' viability and maturation as well as the ability of bortezomib-treated DC to generate a tolerogenic T-cell response.

Material and methods: _____

DC preparation and culture:

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from volunteer donors' buffy coats were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque solution (Amersham Biosciences, Uppsala) and allowed to adhere to a tissue culture dish (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). After 12 hours at 37°C, adherent cells were collected, re-suspended and further purified using anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA); afterwards, cells were again re-suspended in culture medium which consisted of RPMI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Be) L-glutamine (2 mM), penicillin (100 UI/mL) and streptomycin (10 mg/mL) plus 10% human AB serum (Sigma). More than 90% of monocytes / macrophages were obtained as monitored by flow cytometry (data not shown). Approval was obtained from the institutional review board for these studies and informed consent for volunteer donors was provided according to the Declaration of Helsinki.

In order to generate DC, cells were cultured for 7 days and incubated at 37°C and 5% CO₂ in complete medium RPMI supplemented with glutamine (2 mM), penicillin

(100 UI/mL) and streptomycin (100 mg/mL) plus 10% human AB serum. GM-CSF 1000 U / mL (PeProtech) plus IL-4 1000 U / mL (R&D System) were added on the first day of culture. At the third and fifth day of culture, cells were washed and re-suspended in fresh medium plus factors. The effect of bortezomib was assessed by adding the drug (kindly provided by Millenium Pharmaceuticals Inc) at increasing doses, from 0 (controls) to 50nM. Bortezomib was added at the first day of the culture and then at third and fifth day together with the medium renewal. Additionally, in order to induce DC activation, TNF α 20 ng/mL (R&D System) and LPS (1 ug / mL, Sigma) were added (fully activated or mature DC) or not (unstimulated or immature DC) for the last 48 hours to DC cultured at the different doses of bortezomib. Phenotypic analysis was performed to assure > 90% DC purity in the sample using FITC-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) CD3, CD56, CD14, CD19 (Exclusion Kit for dendritic cell studies, Cytognos, Salamanca), PE-conjugated mAbs CD80, CD86 (BD Bioscience, San Jose) and PerCP-conjugated HLA-DR as previously described(24,25).

MLR and re-challenge experiments:

Allogeneic T cells obtained from healthy donors' buffy coats were purified using magnetic beads and MLR were performed using 2 x 10⁶ T-cells as effector cells and monocytes derived DC as stimulators (at a proportion 5:1). The different types of DC used were: DC activated or not with TNF α and LPS cultured in the absence or in presence of bortezomib at 10nM or 50nM; 4 and 8 days after primary stimulation T cells were re-challenged with same donor DC (at a proportion 10:1). IL-2 at 20 U / mL was added to the cultures at the time of re-challenge in order to maintain T cell viability. Forty eight hours after primary or secondary stimulations Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunophenotypic assays were performed to analyze T cell activation and characteristics.

Immunophenotypic analysis and Cytokine staining:

1x10⁶ adherent cells / mL, seeded in 48-well plates, were analyzed by flow cytometry on days 3, 5 and 7 of culture. Cells were analyzed by direct immunofluorescence using four colour staining with mAbs conjugated with the following fluorochromes: Fluorescein (FITC), Phycoerythrin (PE); peridinin chlorophyll protein-Cyanine 5 (PerCP-Cy5) and allo-phycoerythrin (APC). Specific antibodies were purchased from BD Bioscience Pharmingen except for anti-CD25-PE and CD-

40-PE provided by Immunotech, Marseille. To evaluate differentiation of monocytes to DC and DC' maturation the following combinations were used: anti-CD3, CD56, CD14, CD19 - FITC / anti-CD40 or anti-CD80-PE or anti-CD83-PE or anti-CD86-PE / anti-HLA-DR-PerCP.

To analyze the activation and characteristics of T cells co-cultured with the different types of DC the following combinations were used: anti-CD25-FITC / anti-CD3-PE / anti-CD4-PerCP-Cy5 / anti-CD40L (CD154)-APC; anti-CD25-FITC / anti-IFN α -PE / anti-CD4-PerCP-Cy5.5 / anti-CD40L-APC. Briefly, for cell surface staining 100 μ L of sample was incubated for 15 min with the appropriate combination of mAbs at room temperature (RT) in the dark. Cells were centrifuged (5 min at 540 g) and the pellet washed with 4 mL of PBS. Finally, cells were resuspended in 0.5 mL of PBS until analyzed in the flow cytometer. Intracellular detection of IFN α was performed, after staining for surface proteins, using a direct immunofluorescence technique. For this purpose, the IntraStain kit (Dako Cytomation, Denmark) was used, strictly following the recommendations of the manufacturer. After staining for the intracytoplasmic antigens, cells were washed and resuspended in 0.5 mL of PBS until their acquisition in the flow cytometer.

Data acquisition was performed on a FACSCalibur flow cytometer (BDB) using the CellQuest software program (BDB) and the mean fluorescence intensity (MFI, expressed in arbitrary linear units scaled from 0 to 104) for each antigen, gated on the live population, was analyzed using the Paint-A-Gate Pro (BDB) software. Analysis of both intracellular cytokines and percentage of positive cells for surface antigens were performed on the gated population using the Cell-Quest software(25).

ELISA and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) assays:

In order to assess the T-cells' cytokine release, MLR supernatants were obtained 48 hours after primary stimulation or after re-challenge with the different types of DC for IL-2, INF α and IL-10 using a commercially available ELISA (Diaclone, Besançon Cedex, France).

To evaluate the tryptophan (Trp) catabolizing enzyme IDO activity, the different types of DC, stimulated or not with TNF α and LPS, were cultured with increasing doses of bortezomib and supernatants were obtained on days 3, 5 and 7 of culture. Afterwards, IDO activity was evaluated by measuring

kynurenine/Trp ratio in the culture medium according to Alegre et al(26). Briefly, culture mediums were boiled for 10 min and centrifuged at 2500xg for 10 min. Concentration of Kynurenine and Trp were measured in the supernatant in a HPLC system with a Waters C18 column (4.5 mm x 15 cm). The mobile phase was 15 mM acetic acid-sodium acetate (pH 4.0) containing 27 mL/L acetonitrile, and kynurenine was detected at 360 nm and Trp was detected at 285 nm.

Apoptosis assessment:

For the detection of apoptosis cell cultures were performed as previously described and the Annexin V-PE apoptosis detection kit from BD Pharmingen was used. Briefly, a minimum of 0.5 x 10⁶ DC were washed and resuspended in Binding Buffer (1:10 diluted in H₂O) maintaining a cell concentration of 1 x 10⁶ / mL. Annexin V-PE and 7 amino-actinomycin (7-AAD) 5 μ L each were added for 15 minutes and, in order to identify apoptotic DC, the following combination were used: anti-CD3, CD56, CD14, CD19 -FITC / Annexin V-PE / anti-HLA-DR-PerCP and anti-CD3, CD56, CD14, CD19 -FITC / Annexin V-PE / 7 amino-actinomycin (7-AAD). For every condition, 50,000 events were collected and analyzed. The percentage of annexin V-PE positive DC was calculated using the Cell-Quest software (BD).

To further assess the absolute number of annexin V-PE positive DC within the different cell subpopulations, in four additional cases samples were simultaneously acquired using TrucountTM Tubes (BD), which contain a calibrated number of fluorescent micro-beads. The absolute count of annexin V-PE positive or annexin V-PE plus 7-AAD negative cells was then calculated using the following equation: (number of events in region containing annexin V-PE positive cells / number of events in absolute count bead region) x (number of beads per test / test volume).

Antigen uptake assays:

Mannose receptor-mediated fluid phase macropinocytosis, measured by the cellular uptake of FITC-dextran, was used as a surrogate marker for antigen capture. On day 5 and 7 of DC' culture, this is, prior to or after fully activation with TNF α and LPS, samples were incubated in medium containing 1 mg/ml FITC-dextran (molecular mass of 40,000 kDa; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 1 h at 37°C; as a negative control, T cells were incubated with FITC-dextran at the same conditions used for DC culture. After four washes with cold PBS, cells were analyzed by flow cytometry for uptake of FITC-dextran.

In addition, the uptake of cell lysates by the different types of DC was also analysed by flow cytometry. Thus, apoptotic mononuclear cells were labeled PKH-67 for 18 hours according to manufacturer's protocol and DC were pulsed with the PKH-67 labeled cells lysates at a proportion of 5:1. Again, T lymphocytes were used as negative controls. After two washes with cold PBS cells were acquired and analysed by flow cytometry.

Western-blot:

After 5 and 7 days of culture, 10⁶ monocyte-derived DC either stimulated or not with TNF α and LPS and treated or untreated with 10nM and 50nM of bortezomib were studied. Cells were washed with PBS (Gibco) and lysed in ice-cold lysis buffer (140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris pH 7.0, 1 mM pepstatin, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate). Samples were centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 10 min and supernatants were collected. Cell extracts were subjected to 10% SDS/PAGE and blotted onto PVDF membrane (Millipore). Membranes were incubated with rabbit \square anti-caspase 3 (1:30,000), caspase 8 (1:1,000) and caspase 9 (1:1,000) (from BioSciences). Membrane-bound first-step antibodies were reacted with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Bio-Rad) or anti-mouse (Amersham, Pharmacia) antibodies and bands were visualized with a luminol-based detection system with p-iodophenol enhancement.

C-DNA synthesis, RQ-PCR, and quantification of FoxP3 Gene expression:

Total RNAs were isolated from 1 \times 10⁵ to 1 \times 10⁶ T-cells previously cultured with DC as specified above after selection using magnetic beads. RNA was extracted following the manufactured instructions of Quiaqen RNeasy Mini Kit[®] spin column. Reverse transcription was performed according to the rules and protocols approved in the "Europe Against Cancer Program" (EAC). RQ-PCR was carried out on cDNA using the Assays-on-Demand gene expression mixes specific for FoxP3 (Hs00203958_m1) and the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were carried out on the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System. RQ-PCR amplification of the ABL gene was used to assess RNA quality and quantity as well as to normalize the relative quantification of the gene expression using the cycle threshold (Ct) increment method. Data were reported as 2^{- Δ Ct}, which represents the fold differences when normalized to the internal control (ABL)(27).

Statistical analysis:

Mean values and their SD as well as the range and median were calculated for each variable using the SPSS software program (SPSS 11.0, Chicago IL). Comparison between groups was made by analysis of variance (post hoc Scheffé and Tukey tests were performed to confirm differences between groups). In addition, T-test for paired samples was used to compare samples treated or not with the drug and the non-parametric Wilcoxon test was used whenever required. P values less than 0.05 were considered significant.

Results:

Bortezomib affects DC viability

We first tested the effect of bortezomib on DC viability. For that purpose, Annexin V-PE staining and quantification with TruCount[™] tubes were performed in DC cultured for seven days in the presence of GM-CSF and IL-4 (un-stimulated DC) or activated by also adding TNF α and LPS. Interestingly, bortezomib at 50nM showed a detrimental effect on DC viability among samples cultured in the presence of TNF α and LPS. By contrast, DC viability was not significantly affected among cultures performed in the absence of TNF α and LPS (figure 1A).

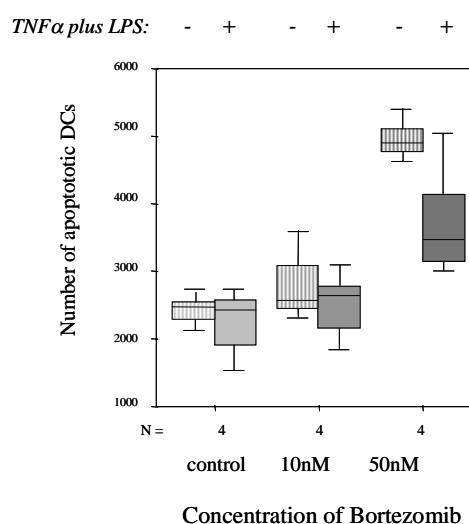


Figure 1A

Figure 1A: Number of apoptotic DCs assessed as annexin-V positive cells using Trucount[™] Tubes on day 7 of DC cultures performed with GM-CSF and IL-4 plus TNF α and LPS added or not on day 5 of culture.

Among DC fully activated with TNF α and LPS (+) mean (95% CI) of annexin-V positive cells were 2395 events

(1731-3056) for samples cultured without bortezomib, and 2835 events (1157-4518) and 4981 events (4107-5855) for samples cultured with 10nM and 50nM of the drug ($p=0.001$)

Among DC un-stimulated with TNF α and LPS (-) mean (95% CI) of annexin-V positive cells were 2189 events (453-3925) for samples cultured without bortezomib, and 2471 events (959-3983) and 3777 events (1097-6456) for samples cultured with 10nM and 50nM of the drug ($p=0.11$)

The percentage of viable (anexin V-PE plus 7-AAD negative) cells was 35%, 27% and 7% among activated DCs cultured without bortezomib or with 10nM and 50nM of the drug, respectively ($p=0.04$). These results indicate that bortezomib induces apoptosis of DC and this effect is higher in conditions which induce fully DC activation.

In order to analyze the mechanisms of bortezomib-induced apoptosis among DC, we performed Western blot analysis assessing the effect of the drug on the activation of caspases. As shown in figure 1B, activation of caspases 8, 9 and 3, as indicated by the presence of their cleaved fragments, was observed among DC exposed to 10 and, especially, at 50nM of bortezomib.

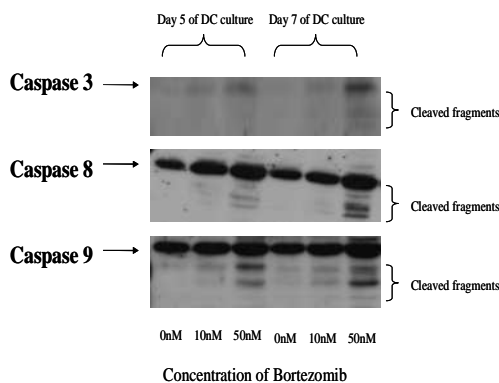


Figure 1B

Figure 1B: Western blot analysis of caspase 8, 9 and 3 among monocytes' derived DC cultured for 5 or 7 days in absence or presence of Bortezomib at 10 and 50 nM

Bortezomib modifies DC maturation pattern

Considering that NF-kB plays a key role in DC maturation, we next tested the effect of bortezomib on the expression of costimulatory molecules and maturation markers in the membrane of DC and on the cytokine secretion pattern. For this purpose only DC on the live gated population was analysed by flow cytometry.

First, we confirmed that stimulated DC overexpressed costimulatory molecules such as CD80, CD86, CD40, CD58 and HLA-DR and maturation markers such as CD83 (figure 2).

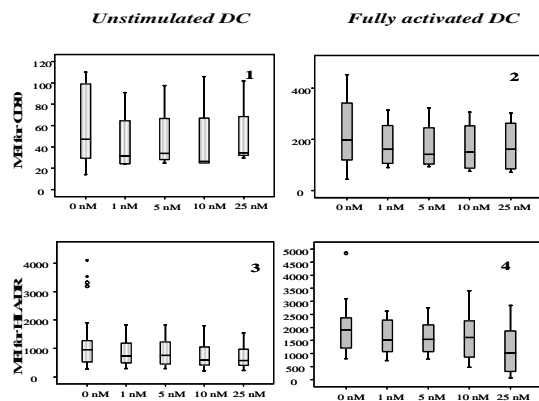


Figure 2

Figure 2: Maturation pattern and costimulatory molecules expression along the monocyte-derived DC culture:

(1) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD80 on the third (15), fifth (18) and seventh day (75 for un-stimulated and 197 for DC fully activated with TNF α and LPS, respectively) of monocyte-derived DC culture; (2) corresponding values for CD86 (1133,1996,2812,3806); (3) for CD83 (15,16,58,120) (3) for CD86 (1133,1996,2812,3806); (4) for CD40 (636,780,1438,2076); (5) for CD58 (60,141,246,330) and (6) for HLA-DR (677,1160,1503,1844) $p<0.05$ for all antigens by comparing the MFI on the seventh day-stimulated DC vs the first or the third day of culture

Next, we tested the effect of bortezomib on the expression of these antigens. For this purpose, increasing doses of the drug were used up to 25nM, since at 50nM the number of events analysed were too small due to the decreased viability of DC at this concentration. Interestingly, the addition of bortezomib significantly decreased the expression of CD83, CD86 and CD40 among DC; also the expression of CD80 decreased although differences did not reach statistical significance. The effect of the drug on the expression pattern for the different antigens is specified in figures 3A and 3B.

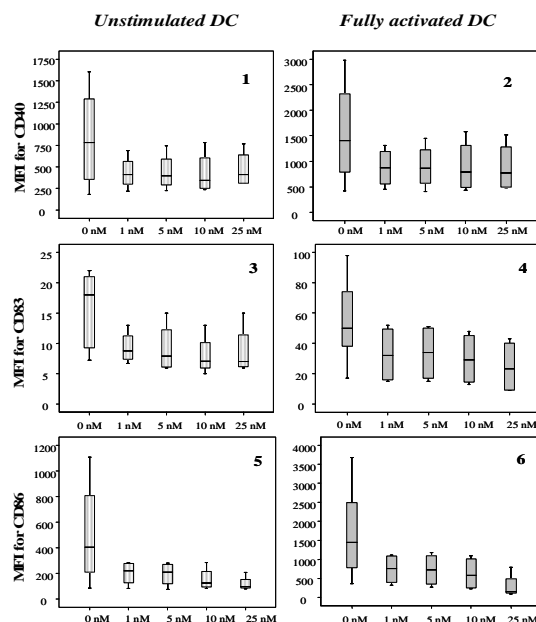


Figure 3A

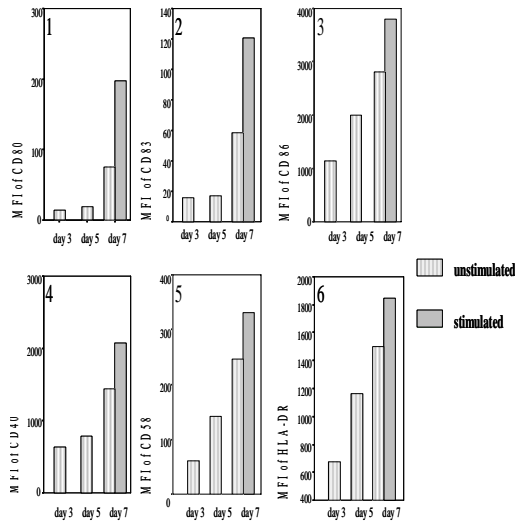


Figure 3B

Figure 3: Dose-response effect of Bortezomib on the expression of CD40, CD80, CD83, CD86 and HLA.DR:

3A: (1) dose-response effect of Bortezomib on the expression of CD40 assessed among immature DC: mean values (SD) being 819 (494) for controls, 430 (196) for samples treated with bortezomib at 1 nM, 440 (221) at 5 nM, 427 (250) at 10nM and 474 (106) at 25 nM of the drug, respectively ($p=0.07$ comparing samples with and w/o bortezomib) (2) and among mature DC: mean values (SD) being 1500 (895) for controls, 877 (387) for samples treated with bortezomib at 1 nM, 884 (438) at 5 nM, 888 (442) at 10nM and 875 (246) at 25nM of the drug, respectively ($p=0.02$ comparing samples with and w/o bortezomib) (3) dose-response effect of bortezomib on the expression of CD83 assessed among immature DC: mean values (SD) being 18.8 (6) for controls, 9 (2.4) for samples treated with bortezomib at 1 nM, 7 (2) at 5 nM, 8 (3) at 10 nM and 8 (4) at 25 nM of the drug, respectively ($p<0.05$ compared to controls for concentrations ≥ 10 nM) (4) and among mature DC: mean values (SD) being 53.9 (26.4) for controls, 32.7 (19) for samples treated with bortezomib at 1 nM, 33.5 (19) at 5 nM, 29.7 (17.8) at 10nM and 24.7 (17.8) at 25 nM of the drug, respectively ($p< 0.05$ compared to controls for concentrations ≥ 10 nM) (5) dose-response effect of bortezomib on the expression of CD86 assessed among immature DC: mean values (SD) being 481 (369) for controls, 200 (94) for samples treated with bortezomib at 1 nM, 193 (93) at 5 nM, 153 (90) at 10 nM and 119 (57) at 25 nM of the drug, respectively ($p<0.05$ compared to controls for concentrations > 1 nM) (6) and among mature DC: mean values (SD) being 1581 (1150) for controls, 737 (403) for samples treated with bortezomib at 1 nM, 725 (437) at 5 nM, 624 (444) at 10nM and 298 (326) at 25 nM of the drug, respectively ($p< 0.05$ compared to controls for concentrations ≥ 1 nM)

3B: (1) dose-response effect of bortezomib on the mean expression of CD80 assessed among immature DC ($p>0.05$ for all comparisons) (2) and among mature DC ($p>0.05$ for all comparisons) (3) dose-response effect of bortezomib on the mean expression of HLA-DR assessed among immature DC ($p>0.05$ for all comparisons) (4) and among mature DC: mean values (SD) being 1919 (845) for controls, 1639 (689) for samples treated with bortezomib at 1 nM, 1592 (639) at 5 nM, 1600 (874) at 10nM and 1411 (554) at 25 nM of the drug, respectively ($p< 0.05$ compared to controls only for concentrations = 25 nM).

Accordingly, bortezomib does not hamper the differentiation from monocytes to DC, but it modifies the maturation pattern of DC, decreasing the expression of several costimulatory molecules.

Effect of bortezomib in the antigen uptake by DC

Immature DC can endocytose apoptotic cells, while upon maturation they lose their ability for capturing antigens. Thus, we evaluated the antigen uptake by DC prior to or after fully activation with TNF α and LPS as a surrogate marker of both viability and maturation. As shown in figure 4, PKH-FITC stained apoptotic-bodies uptake increased along the DC culture and both viable DC cultured with or without bortezomib could efficiently uptake PKH-stained apoptotic cells. Endocytosis was abolished after culture with TNF α plus LPS although the addition of bortezomib partially prevented the loss of endocytic capacity among fully activated DC (figure 4).

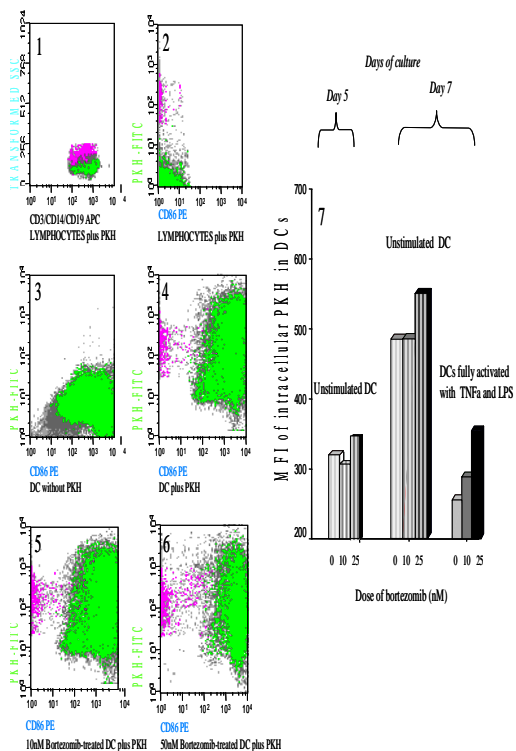


Figure 4

Figure 4: Endocytosis assessed as uptake of PKH-stained apoptotic cells by DC; (1 and 2) PKH uptake among T lymphocytes (negative control) (3) DC cultured without PKH-stained apoptotic cells (negative control); (4) PKH uptake among viable DC cultured without bortezomib or (5) with bortezomib at 10nM and (6) 50nM; (2, 4, 5, 6) PKH-stained apoptotic cells are identified by a high PKH MFI.

(7) bortezomib did not hamper endocytosis among viable DC since no significant differences were observed for the

different doses of bortezomib in terms of PKH-stained apoptotic cells uptake.

Among unstimulated DC, endocytosis increased among DC cultured during 7 days as compared to 5 days (MFI for PKH-FITC = 550 vs 302, respectively; $p=0.03$) while, among DC cultured for 7 days, stimulation with TNF α plus LPS abolished antigen uptake by DC (MFI = 278 for fully activated vs 550 for unstimulated DC, $p=0.01$). Bortezomib at 25 nM partially prevented the loss of endocytic capacity among fully activated DC (MFI for PKH-FITC = 240 vs 370 among DC cultured without bortezomib or at 50nM of the drug, respectively; $p=0.07$).

Similar results were observed by evaluating the endocytosis as uptake of FITC-dextran (data not shown). Thus, bortezomib did not hampered the endocytic capacity of DC.

Effect of bortezomib-treated DC on T lymphocytes after MLR

According to the above mentioned results, bortezomib induced apoptosis in fully activated DC and modified the maturation pattern by decreasing the expression of several costimulatory molecules. Both mechanisms may favour a tolerogenic response among T cells and, to confirm this effect, MLR using DC as stimulators were performed as previously described. Firstly, we used bortezomib-untreated DC activated with TNF α and LPS to stimulate T lymphocytes which were previously cultured with bortezomib-treated DC as previously specified and, interestingly, these T cells did not become activated. This is in contrast to T-cells previously cultured with bortezomib-untreated DC, the mean percentage of CD4+CD25+ cells being 12% (95% CI = 6 – 26%) for samples previously cultured with bortezomib-treated DC vs 43% (95% CI = 24 – 64%) for those samples previously cultured with bortezomib-untreated DC, ($p=0.002$) (figure 5).

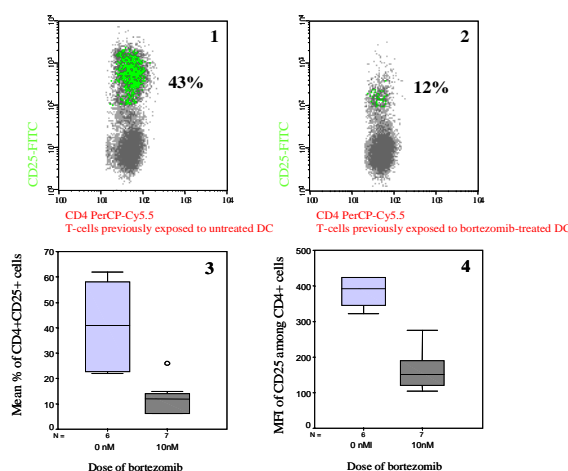


Figure 5

Figure 5: Percentage of activated T lymphocytes (CD4+CD25+ cells) in MLR upon re-challenge with activated DC. While 43% (95% CI = 24-64%) of T cells previously cultured with (1) bortezomib-untreated DC did activate upon re-challenge, only 12% (CI = 6-26%) of T cells previously cultured with (2) bortezomib-treated DC did become activated ($p=0.002$); (3) box-plot comparing mean

percentages; (4) similar results were observed when we considered the MFI for CD4+CD25+ cells.

These results suggested an anergic response among T lymphocytes previously cultured with bortezomib-treated DC.

We next analysed the cytokine secretion pattern in MLR. According to ELISA assays, IFN γ and IL-2 levels were lower in MLR in the primary stimulation when bortezomib-treated DC were used as stimulating cells while, on the contrary, the levels of IL-10 were increased as compared to MLR performed with bortezomib-untreated DC. These differences were higher after first re-challenge with same type DC. The levels of IL-2 were evaluated only in the primary stimulation since IL-2 was added to the cultures after first rechallenge. Also, a trend towards a higher level of IFN γ was observed among T lymphocytes cultured with bortezomib-untreated as compared to treated DC after first re-challenge (figure 6A).

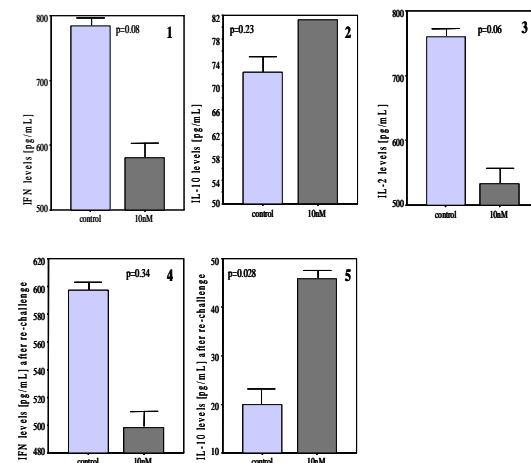


Figure 6A

Figure 6A: (1) levels of IFN γ (mean pg/mL) in MLR after culture of T lymphocytes with untreated (control) versus bortezomib-treated (10nM) DC: 784 vs 580 ($p=0.09$); (2) corresponding values for IL-10: 72 vs 81($p=0.23$) (3) and for IL-2: 760 vs 533 ($p=0.06$); (4) levels of IFN γ (mean pg/mL) in MLR after re-challenge of T lymphocytes with untreated (control) versus bortezomib-treated (10nM) DCs: 597 vs 497 ($p=0.34$); (5) corresponding values for IL-10: 19 vs 46 ($p=0.028$)

Similar features were observed regarding intracellular levels of IFN γ as assessed by flow cytometry (figure 6B).

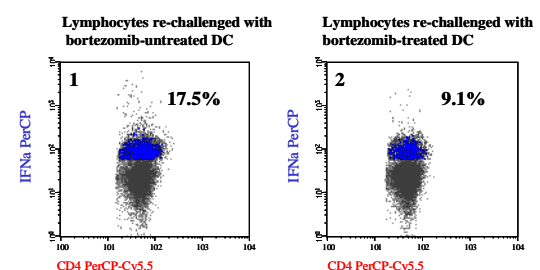


Figure 6B

Figure 6B: Percentage of IFN γ producing T-lymphocytes after re-challenge with (1) bortezomib-untreated (mean = 17.5%) or (2) bortezomib-treated DC (9.1%) ($p=0.07$). Percentage of activated T-cells after rechallenge with (3) bortezomib-untreated (25.7%) or (4) bortezomib-treated DC (13.5%) ($p=0.05$).

In order to gain further insight into the characteristics of the T-cells generated after MLR, we analysed the relative expression of FoxP3 in T-lymphocytes after culture with bortezomib untreated vs treated DC. Interestingly, relative expression of FoxP3 increased from 7.9 (SD: 3.2) to 14.3 fold (SD: 1.8) upon comparing T lymphocytes which were not exposed to DC vs those cocultured with untreated DC ($p=0.13$). By contrast, when T cells were cocultured with bortezomib-treated DC Fox-P3 expression increased from 7.9 (SD: 3.2) to 21.9 fold (SD: 3.4), $p=0.007$ (figure 7A).

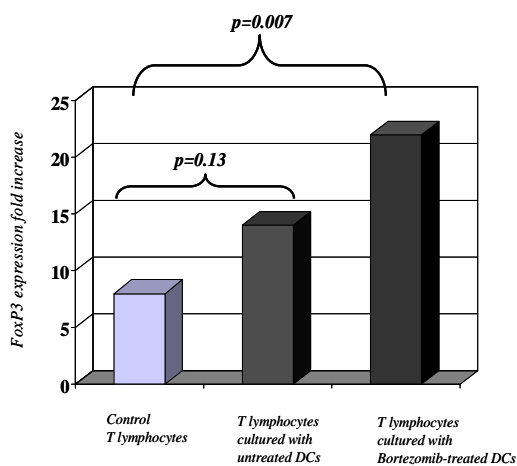


Figure 7A

Figure 7A: relative expression of FoxP3 among T lymphocytes not exposed to DC vs those cocultured with untreated versus treated DC. When T cells were cocultured with bortezomib-treated DC Fox-P3 expression increased from 7.9 (SD: 3.2) to 21.9 fold (SD: 3.4), $p=0.007$

Accordingly, bortezomib-treated DC significantly increased the relative expression of FoxP3 among T lymphocytes.

Finally, we compared the IDO activity among bortezomib treated vs untreated DC. No significant differences were observed between the different DC subsets, mean values for the tryptophan to kinurenin ratios ranging, on day 7th of culture, from 0.07 to 0.1 for the different concentrations of the drug (figure 7B). By contrast, IDO activity significantly increased during the cell culture from day 3 to day 7 of monocyte's derived DC culture, as shown in figure 7B.

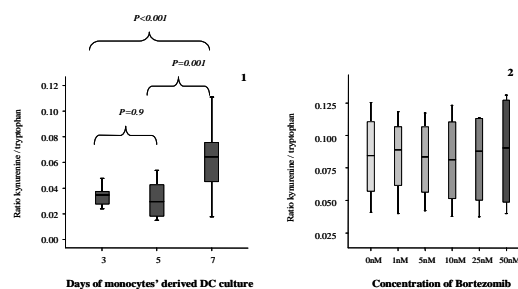


Figure 7B

Figure 7B: (1) tryptophan to kinurenin ratios significantly increased from 0.05 (SD: 0.004) on day 3 to 0.08 (SD: 0.02) on day 7th of monocyte's derived DC culture, $p<0.001$; (2) no differences in the IDO activity was observed on day 7th of culture depending on the concentration of bortezomib.

Discussion:

In steady state, immature DC can continuously take-up dying cells and soluble proteins which results in peripheral tolerance, thus modulating the reactivity of the T cell repertoire(28). By contrast, exposure to a microbial infection or conditions of tissue disruption or inflammation favours DC maturation(6) characterized by the overexpression of costimulatory and adhesion molecules, which triggers immune response. In vivo models have shown that total body irradiation from the preparative regimens can rapidly induce the functional maturation of host DC(29), which favours the development of GVHD after allogeneic transplant(2,3). In this setting, increased levels of cytokines such as TNF α and IFN γ , predict the onset of GVHD (30). Based on this concept, attempts to reduce GVHD by blocking DC maturation have been reported showing promising results(31-33). In this regard, Jonuleit et al(34) showed that while repetitive stimulation with mature DC resulted in a strong expansion of alloreactive T cells, repetitive stimulation with immature DC inhibited T cells proliferation and production of IFN α , IL-2 and IL-4. In vivo, Dhodapkar et al(13) showed that the injection of immature DC pulsed with influenzae matrix peptide (MP) and keyhole limpet hemocyanin (KLH) in two healthy subjects led to the specific inhibition of MP-CD8 $^{+}$ T cells and the appearance of MP-specific interleukin 10-producing cells. Unfortunately, results of these studies, performed in steady state conditions, are difficult to reproduce in the transplant setting since the infusion of immature DC would lead to an in vivo maturation due to the cytokine storm generated in the context of allogeneic stem cell transplantation(6). In the current study, we have evaluated the capability of the proteasome inhibitor bortezomib to inhibit DC maturation even after exposure to TNF α and LPS, thus reproducing the proinflammatory

milieu observed in the transplant setting. We observed that, even under this condition, bortezomib impaired the expression of costimulatory molecules and maturation markers such as CD86, CD40 and CD83. Interestingly, the blockade of CD86 as well as the CD154-CD40 costimulation pathway might lead to specific T cell anergy(35), as shown in rodent and in vitro studies using monoclonal antibodies. Nevertheless, the blockade of some of these pathways with specific antibodies may result in unexpected complications in primates and humans(35,36). By contrast, bortezomib is currently used in the clinical setting and has a well known safety profile.

Furthermore, bortezomib-treated DC may induce a tolerogenic response in T cells as suggested by the cytokine pattern observed after MLR, which was characterized by decreased levels of IFN α and IL-2. Interestingly, this cytokine pattern has been related to a lower risk of GVHD(29) in the transplant setting. Moreover, higher levels of IL-10 were also observed after MLR, which can drive the development of regulatory T cells and induce tolerance(37).

In addition, T lymphocytes cultured with bortezomib-treated DC did not efficiently activate upon restimulation with fully activated DC from the same donor, indicating either an anergic or a tolerogenic T cell response. It is worth mentioning that, using the NF- κ B inhibitor Bay 11-7082, it has also been described that T-cell proliferation was reduced in response to Bay-treated allogeneic DC(38). By contrast, the authors found that T-lymphocytes stimulated with Bay-treated DC in the primary culture contained the highest proportion of cells expressing IL-2 or IFN γ upon restimulation with PMA/ionomycin. Interestingly, we found the opposite results when restimulating T-cells with the same donor DC which could suggest that these T cells can be activated after PMA/ionomycin stimulation while remaining anergic upon re-challenge with the same donor antigens. In addition, T-cells initially stimulated with mature DC might be exhausted in the subsequent re-challenges in the absence of IL-2 in the medium, as suggested by Thomson and colleagues(38). Finally, IL-2 could be required in the culture in order to maintain or allow a regulatory T-cell response, as recently suggested(39).

Sun et al(40) have already reported that, in a mouse model, the use of bortezomib immediately after allogeneic bone marrow transplantation (BMT) prevents the development of GVHD while, in vitro, potently inhibited MLR and promoted the apoptosis of alloreactive T cells(40). We found similar effects in terms of depletion of alloreactive T cells after MLR when human alloreactive T lymphocytes were cocultured in the presence of

bortezomib(24). By contrast, resting T-cell viability was unaffected by the drug. Nevertheless, delayed administration of the drug increased GVHD susceptibility and mortality in a major histocompatibility disparate model(41). Accordingly, the early administration of bortezomib in the BMT should prevent the development of GVHD through its effect not only on T cells but also on host DC, thus justifying a higher efficacy in terms of prevention of GVHD when the drug is administered immediately prior to or early after transplantation. In this regard, rhesus macaques recipients of a kidney allograft who received 15-deoxypergualin, a specific inhibitor of NF- κ B, had exceptionally high rates of stable grafts without rejection or immunosuppression. An early increase of IL-10 and reduction of IFN γ and IL-12 distinguished recipients that subsequently became tolerant(42). Interestingly, this pattern is similar to the one we observed by treating DC with bortezomib while, when we treated T lymphocytes(24), IFN γ and IL-2 levels decreased but IL-10 remained unmodified, thus indicating that not only the effect of the drug on T-cells but also on DC justify the results reported in these in vivo studies.

In addition to the immunophenotypic and cytokine pattern, it should also be mentioned the proapoptotic effect of bortezomib on DC when cultured with TNF α and LPS since previous studies have suggested that the depletion of host DC may also decrease the risk of GVHD(43).

Similar results have been reported regarding DC viability and activation blockade using bortezomib(44,45). Thus, Nencioni et al elegantly described the intracellular pathways involved in these effects. In the current study, we have further addressed the effect of bortezomib-treated DC on the immune response of T cells, showing that T cells cultured with bortezomib-treated DC not only displayed an anergic response against the same-donor fully-activated DC, as reported by Straube et al(46) but, in addition, both the cytokine pattern as well as the FoxP3 expression, suggested that T lymphocytes exposed to bortezomib-treated DC showed characteristics of regulatory T cells.

Remarkably, Yamazaki et al(47) have reported that untreated DC expand alloantigen-specific FoxP3+ CD25+CD4+ regulatory T cells from a purified CD25+CD4+ population. According to our data, bortezomib-treated DC increase the expression of FoxP3 among unselected T lymphocytes. Other agents such as IL-10, TGF β , glucocorticoids, vasoactive intestinal peptide or vitamin D3 orientate DC to induce tolerance and, for most of them, NF- κ B downregulation contributes to the decision of DC to differentiate T lymphocytes into regulatory T cells(9,10,32-36). It has been

previously reported that indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a tryptophan-catabolizing enzyme, is one of the mechanisms exploited by DC in order to induce a tolerogenic T cell response. Accordingly, we analysed the IDO activity of bortezomib-treated DC and, in the experimental conditions described in the current study, bortezomib did not modify IDO activity on DC. This results should be in accordance to a recent study by Tas et al(48) which showed that NF- κ B signalling is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction, so that mechanism other than IDO should be responsible for the immunoregulatory effect induced by bortezomib as well as agents involved in NF- κ B downregulation.

Finally, bortezomib treatment affected neither antigen uptake nor apoptotic cell endocytosis and this property could be exploited, by pulsing bortezomib-treated DC with specific antigens, in order to induce antigen-specific suppression of the immune response(13). This is in contrast with the results from Nencioni et al who showed that bortezomib decreased antigen uptake(44). According to our experience, when we evaluated endocytosis within viable DC by both FITC-dextran or PKH-67 labeled cell lysates, bortezomib did not hamper endocytosis.

In conclusion, bortezomib induced apoptosis and modified the maturation pattern and cytokine secretion of dendritic cells which promoted a tolerogenic response among allogeneic T cells. These properties may allow to promote immunotolerance in the transplant setting.

References: _____

1. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 621-7.
2. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen presenting cells. *Science* 1999; 285: 412-5
3. Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, et al. Distinct roles for donor and host derived antigen presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus -host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005; 105: 2227-34.
4. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 351-8.
5. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21: 685-711.
6. Ferrara JL, Cooke KR, Teshima T. The pathophysiology of acute graft versus host disease. *Int J Hematol* 2003; 78: 181-7
7. Fresnay S, Garnache-Ottou F, Plumas J, et al. Can tolerogenic dendritic cells help to modulate allo-immune responses in the setting of hematopoietic cell transplantation?. *Transplant Immunology* 2003; 11: 259-66.
8. Chan GW, Gorgun G, Miller KB, et al. Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 170-6.
9. Penna G and Adorini L. 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of Dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164: 2405-11.
10. Hackstein H, Taner T, Zahorchak AF, et al. Rapamycin inhibits II-4 induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* 2003; 101: 4457-63.
11. Beith S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214-9.
12. Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 4120-6.
13. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 15: 233-8.
14. Ghosh S, May M, Koppp E. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators to immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-60
15. O'Sullivan B, Thomas R. CD40 ligation conditions dendritic cells antigen-presenting function through sustained activation of NF- κ B . *J Immunol* 2002; 168: 5491-98.
16. Tas SW, de Jong EC, Hajji N, et al. Selective inhibition of NF- κ B in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and

- polarization. *Eur J Immunol.* 2005; 35: 1164-74.
17. Matsumoto M, Yamada T, Yoshinaga SK, et al. Essential role of NF- κ B inducing kinase in T cell activation through the CDR/CD3 pathway. *J Immunol* 2002; 169: 1151-8.
 18. O'Keeffe M, Grumont RJ, Hochrein H, et al. Distinct roles for the NF- κ B1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 2005; 106: 3457-64.
 19. Akira S, Takeda K. Toll like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.
 20. Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3: 221-7.
 21. Kriehuber E, Bauer W, Charbonnier AS, et al. Balance between NF- κ B and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood* 2005; 106: 175-83.
 22. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, et al. The ubiquitin proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell.* 1994; 78: 773-85.
 23. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3071-6.
 24. Blanco B, Pérez-Simón JA, Sánchez-Abarca LI, et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* 2006; 107: 3575-83
 25. Almeida J, Bueno C, Alguero MC, et al. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage-cells. *Clin Exp Immunol* 1999; 118:392-401.
 26. Alegre E, López AS, González A. Tryptophan metabolites interfere with the Ehrlich reaction used for the measurement of kynurenine. *Analytical Biochemistry* 2005; 339: 188-89
 27. Gabert J, Beillard E, van dV, V, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N. et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 2003;17: 2318-57.
 28. Steinman RM, Hawiger D, Liu K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987; 15-2.
 29. Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, et al. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T-cell mediated acute-graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2002; 109: 1335-44
 30. Ritchie D, Seconi J, Wood C, et al. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11: 706-12.
 31. Hackstein H, Thomson A. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 24-34.
 32. Ichim TE, Zhong R, Min WP. Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol.* 2003; 295-306.
 33. Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernández-Martin A, et al. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft versus host disease while maintain graft versus tumor. *Blood* 2006; 107: 3787 - 94.
 34. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000; 192: 1213-22.
 35. Jonker M, Ossevoort MA, Vierboom M. Blocking the CD80 and CD86 costimulation molecules: lessons to be learned from animal models. *Transplantation.* 2002; 73: S23-6.
 36. Yamada And A, Sayegh MH. The CD154-CD40 costimulatory pathway in Transplantation. *Transplantation.* 2002; 73: S36-9.
 37. de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26: 289-307.
 38. Thompson A, O'Sullivan B, Beamish H, et al. T Cells signalled by NF- κ B negative dendritic cells are sensitised not anergic to subsequent activation. *J Immunol* 2004; 173: 1671-80.

39. Zorn E, Nelson E, Mohseni M, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 2006; 108: 1571-9.
40. Sun K, Welniak LA, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Inhibition of acute graft versus host disease with retention of graft versus tumor effects by the proteasome inhibitor Bortezomib. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101: 8120-5.
41. Sun K, Wilkins DE, Anver MR, et al. Differential effects of proteasome inhibition by bortezomib on murine acute graft versus host disease: delayed administration of bortezomib results in increased GVHD-dependent gastrointestinal toxicity. *Blood.* 2005; 106: 3293-9.
42. Hutchings A, Wu J, Asiedu C, et al. The immune decision toward allograft tolerance in non-human primates requires early inhibition of innate immunity and induction of immune regulation. *Transpl Immunol.* 2003; 11: 335-44.
43. Chan GW, Gorgun G, Miller KB, et al. Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft versus host disease. *Biol Blood and Marrow Transplant.* 2003; 9: 170-6.
44. Nencioni A, Schwarzenberg K, Brauer KM, et al. The proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation. *Blood.* 2006; 108: 551 – 8
45. Naujokat C, Berges C, Höh A, Wieczorek H, Fuchs D, Ovens J et al. Proteasomal chymotrypsin-like peptidase activity is required for essential functions of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 2007; 120:120-32
46. Straube C, Wehner R, Wendish M, Bornhäuser M, Bachmann M, Rieber EP, Schmitz M. Bortezomib significantly impairs the immunostimulatory capacity of human myeloid blood dendritic cells. *Leukemia* 2007; 21: 1464-71.
47. Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M et al. Effective expansion of alloantigen-specific FoxP3+ CD25+CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *PNAS* 2006; 103: 2758-63
48. Tas S, Vervoordeldonk M, Hajji N, Schuitemaker J, van der Sluijs K, May M et al. Noncanonical NF- κ B signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood* 2007; 110: 1540-49

5.3 CAPITULO TRES: BORTEZOMIB Y SIROLIMUS

Durante más de 20 años, se ha empleado como profilaxis de la EICH la combinación de un inhibidor de CaN y MTX, a pesar de que una alta proporción de pacientes desarrolla EICH. El uso de una depleción de células T reduce el riesgo de EICH, pero incrementa de forma notoria la aparición de infecciones y recaídas. Por tanto es necesario desarrollar nuevas estrategias que sean capaces de disminuir la EICH manteniendo el sistema inmune activo frente a infecciones o células tumorales.

- El sirolimus es un inhibidor de mTOR que bloquea la vía PI3K/AKT y expande linfocitos Treg en cultivo, disminuyendo la incidencia de la EICH. Desafortunadamente la combinación de sirolimus con los inhibidores de CaN incrementa el riesgo de microangiopatía o enfermedad venooclusiva y bloquea el desarrollo de Treg.

- El Bortezomib es un inhibidor de proteosoma que impide la activación y transcripción de NF- κ B. Nuestro grupo ha demostrado que elimina de forma selectiva los LT alorreactivos y en los dos capítulos previos hemos argumentado su habilidad para generar tolerancia por su acción sobre los linfocitos Treg y las CDs.

Por tanto, en este tercer capítulo, nos propusimos evaluar la combinación de bortezomib con sirolimus debido a que ambas drogas podrían favorecer el desarrollo de una respuesta inmunotolerante tras el trasplante. Comprobamos que el Bortezomib a 100nM junto con el sirolimus a 0,5 ó 5nM no afectaban la viabilidad linfocitaria; a pesar de lo cual eran capaces de disminuir la activación y la proliferación linfocitaria. Además evidenciamos que la combinación reducía de forma significativa la secreción de citoquinas Th1 (IL-2, TNF α e IFN γ), implicadas en el desarrollo de EICH. Esta reducción no tenía lugar en las Th2 a excepción de la citoquina IL-6.

En los ensayos de western-blot confirmamos que solamente el sirolimus (no el bortezomib) inhibía la fosforilación de Akt y Erk. Cuando empleábamos la combinación de bortezomib y sirolimus se producía también una inhibición de la fosforilación de Akt y Erk. Esto nos condujo a pensar que el sirolimus bloquea vías de escape del Bortezomib.

Estos hallazgos se evaluaron *in vivo* mediante el modelo murino de trasplante hematopoyético (BALB/c→C57BL/6). La administración de la combinación de bortezomib y sirolimus redujo la incidencia de EICH y prolongó la supervivencia de los ratones de manera significativa en comparación con los fármacos por separado o la combinación de CsA y sirolimus, empleada en clínica. Además, la combinación mantenía la respuesta por parte del sistema inmune frente a otros antígenos e incluso el EICL.

En conclusión, la combinación de bortezomib y sirolimus permite conseguir aminorar la aparición de EICH manteniendo el EICL, lo cual ha sentado las bases para el desarrollo de un ensayo clínico a nivel europeo para testar la eficacia de esta combinación como profilaxis de EICH.

The novel combination of sirolimus and bortezomib prevents graft-versus-host disease but maintains the graft-versus-leukemia effect after allogeneic transplantation

Teresa Caballero-Velázquez, Luis Ignacio Sánchez-Abarca, Belén Blanco, Carmen Herrero, Silvia Gutierrez-Cosio, Soraya Carrancio, Concepción Serrano, Consuelo del Cañizo, Jesús F San Miguel, José A Pérez-Simón

Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Salamanca; Centro de Investigación del Cáncer (CIC/CSIC), Centro en Red de Medicina Regenerativa de Castilla y León

Abstract:

New strategies are required in order to reduce GVHD without hampering GVL. Sirolimus, an mTOR inhibitor, decreases the risk of GVHD and increases the number of Treg after transplantation. Unfortunately, its use may increase the risk of microangiopathy and, moreover, its combination with calcineurin inhibitors blocks the development of Treg. Bortezomib is a proteasome inhibitor that blocks the nuclear translocation and activation of NF- κ B. We have recently shown that it induces depletion of alloreactive T-cells and allows the expansion of T-cells with suppressive properties. On the basis of these data, we have analyzed the effect of sirolimus in conjunction with bortezomib and confirmed that this combination synergistically inhibits activation and proliferation of T-cells. The combination also decreases the production of Th1 cytokines. These effects are at least in part mediated by the inhibitory effect on pERK and pAkt pathways. Finally, a mismatched mouse model confirmed that the combination decreases the risk of GVHD and enables the induction of specific immune-tolerance against the host, maintaining the immune response against other antigens and maintaining the GVL effect. In conclusion, the capacity of this combination to prevent GVHD while maintaining the GVL effect makes it worthy of investigation at the clinical level.

Introduction

Graft-versus-host disease (GVHD) represents a major challenge and the main cause of morbidity and mortality after allogeneic transplantation. Its incidence varies greatly with the type of donor and the immune suppression used to prevent it. Standard GVHD prophylaxis is currently based on the use of a calcineurin inhibitor plus methotrexate (MTX). In fact, this combination has been used for more than 20 years, and remains the standard of care, although the incidence of acute GVHD is in the range of 20-40% among patients receiving hematopoietic stem cells from a matched, related donor and even higher after unrelated donor transplant⁽¹⁻³⁾. The incidence of chronic GVHD is in the range of 40-70% when using this combination after peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation, and more than one-third of the patients require immunosuppression for up to four years after receiving the transplant^(3,4). These data suggest that immune tolerance is not maintained over the long term in an important subset of patients, and, in fact, it is consistent *in vitro* studies showing that calcineurin inhibitors blockade the expansion and function of regulatory T-cells⁽⁵⁻¹⁰⁾ (Treg), which are essential for generating a

tolerogenic immune response. The use of *in vivo* or *in vitro* T-cell depletion has significantly reduced the risk of GVHD but has not led to improved survival, due to an increase in the incidence of severe infections and relapses^(11,12). For this reason, new strategies are being evaluated in an attempt to decrease GVHD without hampering the graft-versus-leukemia (GVL) effect. These strategies should ideally enable Treg to be expanded in order to avoid the use of immune-suppressive drugs over the long term.

Sirolimus is the first commercially available inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). Several studies and clinical trials have confirmed that sirolimus allows the risk of GVHD to be reduced after both related and unrelated donor transplant⁽¹³⁾. In addition, an antileukemic effect has been reported *in vitro*^(14,15); moreover, using *in vitro* assays, several studies have shown an increase in the number of Treg after sirolimus exposure⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Unfortunately, at least using myeloablative conditioning, the use of sirolimus in combination with calcineurin inhibitors may increase the risk of microangiopathy⁽¹⁹⁾, blocks

the development of Treg⁽²⁰⁾ and may subsequently hamper tolerance in the long term⁽²¹⁾.

Bortezomib, a boronic acid dipeptide, is a potent, selective and reversible inhibitor of proteasome⁽²²⁾. The proteasome is a multi-enzyme complex present in all cells. It degrades proteins that regulate cell-cycle progression and causes proteolysis of the ubiquitinated endogenous inhibitor of nuclear factor- κ B (NF- κ B), I κ B. The latter blocks the nuclear translocation and transcriptional activity of NF- κ B^(23,24). In normal T lymphocytes NF- κ B translocation to the nucleus only occurs after TCR/CD3 and co-stimulatory molecule engagement, while it is not activated in resting T lymphocytes. In our experience, bortezomib induces selective depletion of alloreactive T cells after a mixed lymphocyte culture⁽²⁵⁾, which could be of value in the clinical setting for preventing GVHD, as recently shown by Koreth et al. in a clinical trial⁽²⁶⁾. Interestingly, we have shown that bortezomib does not affect the viability of Treg and allows the expansion of T-cells with suppressive properties⁽²⁷⁾. Accordingly, both sirolimus and bortezomib could favor the development of a tolerogenic immune response after allogeneic transplantation.

On the basis of these findings, the current study analyzes the potential synergistic effect of sirolimus together with bortezomib in the activation pattern of T cells and in the expansion of Treg. We have evaluated the synergy between both drugs in a murine model⁽²⁸⁾ in order to prevent GVHD.

Material and methods

Animals

All animal protocols were approved by the University of Salamanca, Animal Care and Use Committee. Female BALB/c (H2d) and male C57BL/6 (H2b) mice were purchased from Charles River Laboratory, France. Animals were kept in specific pathogen-free conditions. Mice were between 8 and 12 weeks of age at the start of the experiments.

Donor mice C57BL/6 were sacrificed by cervical dislocation and bone marrow (BM) and spleen were harvested by standard techniques. Spleen-cell preparations were obtained by gently crushing the tissues to release the cells. Preparations were filtered to remove debris and washed twice in PBS for injection.

BALB/c (H2d) mice were used as recipients in the graft-versus-host disease (GVHD) model systems. Recipient mice received total body irradiation (850 cGy divided in two fractions) from a Cs source. Irradiation was followed by the infusion of 5×10^6 C57BL/6 allogeneic donor BM cells intravenously with or without splenocytes ($5-10 \times 10^6$ cells intravenously) as a source of allogeneic T cells. Recipient mice then received RPMI, or sirolimus in RPMI at a dose of 0.25 μ g/kg intra-peritoneally on days 0 to 12 post-transplant and/or bortezomib at a dose of 1 μ g/day intravenously on days 0, 1 and 2 post-transplant and/or cyclosporine A at a dose of 10 to 15 μ g/kg intra-peritoneally on days 0 to 12 post-transplant. Mice were monitored and weighed twice a week. All moribund mice were humanely killed.

In addition, NOD.CB17-*Prkdc*^{scid} (NOD/SCID) mice received bone marrow plus splenocytes from BALB/c mice which had stable C57BL/6 hematopoiesis and had not developed GVHD after receiving prior transplantation of BM plus splenocytes and GVHD prophylaxis with sirolimus and bortezomib.

Finally, in order to induce leukemia in the mice, 5×10^4 WEHI 3b d+ clone 17.3 GFP+ cells (myelo-monocytic leukemic cell line from BALB/c background) were infused after total body irradiation to BALB/c mice together with 5×10^6 C57BL/6 BM cells (controls) or with BM plus splenocytes and sirolimus plus bortezomib as GVHD prophylaxis.

All experiments were performed at least twice and included four animals per group.

The degree of systemic GVHD was assessed by a standard scoring system that incorporates five clinical parameters: weight loss, posture (hunching), activity, fur texture, and skin integrity. Each parameter received a score of 0 (minimum) to 2 (maximum). Transplanted mice were ear-punched, and individual weights were obtained and recorded on day 0 and twice a week thereafter. At the time of analysis, mice from coded cages were evaluated and graded for each criterion. Acute GVHD was also assessed by detailed histopathological analysis of skin, liver and intestine.

Chimerism assays were performed in peripheral blood, spleen and bone marrow at 14 days after transplantation. For this purpose, 5×10^5 cells were stained by direct immunofluorescence using monoclonal antibodies (MoAbs) conjugated with the

following fluorochromes: fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE); peridinin chlorophyll protein-Cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5) and AlexaFluor. Specific antibodies were purchased from Becton Dickinson Bioscience (BDB) Pharmingen (San Jose, CA). The following combination was used: anti-H2Db-FITC / anti-H2Dd-PE / anti-CD45-PerCP-Cy5.5 / anti-CD34-AlexaFluor or anti-H2Db-FITC / anti-H2Dd-PE / anti-CD45-PerCP-Cy5.5 / anti-CD3-AlexaFluor. Data were acquired immediately after completion of sample preparation using a FACSCalibur flow cytometer (BDB) equipped with the CellQuest™ program (BDB).

Cell cultures:

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from volunteer donors' buffy coats were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque solution and allowed to adhere to the tissue culture dish (BD, Franklin Lakes, NJ). After 2 hours at 37°C non-adherent cells were collected, washed and resuspended in a culture medium consisting of RPMI 1640 L-glutamine (2 mM), penicillin (100 UI/mL) and streptomycin (10 mg/mL) plus 10% human AB serum (Sigma). More than 90% of the monocytes / macrophages were eliminated during monitoring by flow cytometry (data not shown) and T-cells were further purified using anti-CD3 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) as required. Approval was obtained from the institutional review board for these studies and informed consent for volunteer donors was provided according to the Declaration of Helsinki.

Activation analysis:

2×10^5 non-adherent lymphocytes per well were seeded in 96-well plates, and cultured in medium alone or stimulated with plate-bound anti-CD3 (5 μ g/ml) plus soluble anti-CD28 (2.5 μ g/ml). Different concentrations of sirolimus, bortezomib or a combination of the two (at doses of 0.5 nM and 5 nM of sirolimus and 100 nM of bortezomib for the combination studies) were added. Activation assays were performed on the second day of culture. Cells were stained using the following four-color combination of MoAbs: anti-CD25-FITC / anti-cytoplasmic IFN γ -PE / anti-CD4-PerCP-Cy5.5 / anti-CD40L-allophycocyanin, all purchased from BDB except for anti-CD25-PE, which was obtained from Immunotech. For intracellular cytokine staining, brefeldin A (10 μ g/mL) was added during the last four hours before acquisition. Simultaneous staining for intracytoplasmic IFN- γ and CD40L and surface antigens was performed

using the IntraStain Fixation and Permeabilization kit (Dako Cytomation, Denmark). Data were acquired on a FACSCalibur flow cytometer (BDB) using the CellQuest program (BDB) and analyzed using Infinicyt software (Cytognos, Salamanca Spain).

Proliferation and apoptosis assessment:

For the proliferation assays 2×10^5 non-adherent lymphocytes, stained with the green fluorescent dye PKH-67 (Sigma), were seeded in 96-well plates and cultured in medium alone or stimulated with plate-bound anti-CD3 (5 μ g/ml) plus soluble anti-CD28 (2.5 μ g/ml) MoAbs. Bortezomib and/or sirolimus were added to the culture as previously specified. After four days, cells were collected, stained with CD25-PE, 7-amino-actinomycin (7AAD) and anti-CD3-APC MoAbs and analyzed by flow cytometry. The ModFit program was used to calculate the percentage of resting (PKHhighCD25-) and proliferating cells.

To detect apoptosis, cell cultures were managed as previously described and the Annexin V-PE / 7 AAD apoptosis detection kit from BD Pharmingen was used. Briefly, a minimum of 5×10^5 T lymphocytes were washed and resuspended in Binding Buffer (1:10 diluted in H₂O), maintaining a cell concentration of 1×10^6 / mL. Annexin V-PE and 7-AAD 5 μ L were each added and incubated for 15 minutes. In order to identify activated T lymphocytes, anti-CD25-FITC and anti-CD3-APC were also added. For every condition, 50,000 events were collected and analyzed. The percentage of annexin V-PE plus 7-AAD negative lymphocytes was calculated using the Paint-A-Gate Pro program (BD).

Cytokine assays:

To measure the release of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon (IFN- γ), by stimulated T-cells, we used the BD Human Th1/Th2 Cytokine CBA kit (BDB). The assays were performed according to the manufacturer's instructions on supernatant collected four days after stimulation with anti-CD3 (5 μ g/mL) and anti-CD28 (2.5 μ g/mL). For the Th1/Th2 cytokine CBA kit, 50 μ L of supernatant were stained with the mixture of human cytokine capture bead suspension and the phycoerythrin (PE) detection reagent. After 3 hours of incubation, samples were washed and then analyzed in a FACSCalibur (BDB) flow cytometer by using the BD CBA program.

Human Th1/Th2 cytokine standards provided with the kit were appropriately diluted and used in parallel with samples to prepare the standard curves.

Western blot analysis:

5 x 10⁶ Jurkat T cells were seeded in six-well plates (Corning, NY) and were stimulated with plate-bound anti-CD3 (5 μ g/ml) and soluble anti-CD28 (2.5 μ g/ml) mAbs (BD Biosciences). Either medium, sirolimus 5 nM, bortezomib 100 nM, or the combination sirolimus 5 nM + bortezomib 100 nM was added at the beginning of the culture. After 48 hours cells were washed with PBS (Gibco) and lysed in ice-cold lysis buffer (140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris pH 7.0, 1 μ M pepstatin, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate). Samples were centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 10 min and supernatants were collected. Cell extracts were subjected to 10% SDS/PAGE and blotted onto PVDF membrane (Millipore). Membranes were incubated with rabbit anti-pAkt (1:500) (Cell Signaling), mouse anti-pErk (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and anti- α tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Membrane-bound first-step antibodies were reacted with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (1:5000) or anti-mouse (1:1000) (AmershamTM) and bands were visualized with an ECL Western Blotting Detection Kit (AmershamTM).

Statistical analysis:

Mean values and their standard deviations, as well as the range and median, were calculated for each variable in SPSS (SPSS 11.0, Chicago IL). Groups were compared by analysis of variance (with post-hoc Scheffé and Tukey tests performed to confirm differences between groups). A two-way measurement of variance (two-way MR-MANOVA) was done to compare the effect of the different drug doses within the different types of culture and to evaluate the effect of the drug on the signs of GVHD at different times. Kaplan-Meier product-limit estimates were used to evaluate the effect of the drug on survival. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Effect of sirolimus and bortezomib on T-cell activation, proliferation and viability:

First, we separately evaluated the effect of sirolimus and bortezomib on T-cell activation, proliferation and viability. As shown in figures 1A and 1B, both drugs

induced a dose-response inhibition in T-cell activation and proliferation of T-lymphocytes stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28. Regarding sirolimus, although its effect was observed at all the different doses analyzed, the most significant effect was observed for doses ≥ 50 nM both for activation and proliferation, while viability was affected at doses ≥ 500 nM. As far as bortezomib is concerned, a dose-response was observed although its effect on activation and proliferation was not significant for doses ≤ 100 nM, while viability was greatly affected at doses > 1000 nM. Considering that a concentration of 0.5-5 nM of sirolimus and of 100 nM of bortezomib did not significantly affect any of the parameters analyzed, we chose these concentrations in order to evaluate the synergistic effect of the two drugs.

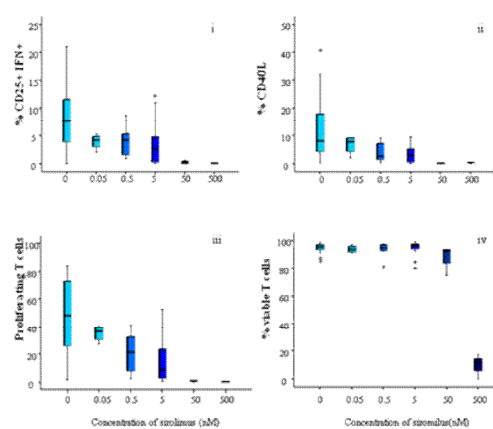


Figure 1A

Figure 1A: Box-plot showing the dose-dependent effect of sirolimus on T-cell activation (i,ii) and proliferation (iii). Viability (iv) of T-cells only decreased at doses ≥ 500 nM.

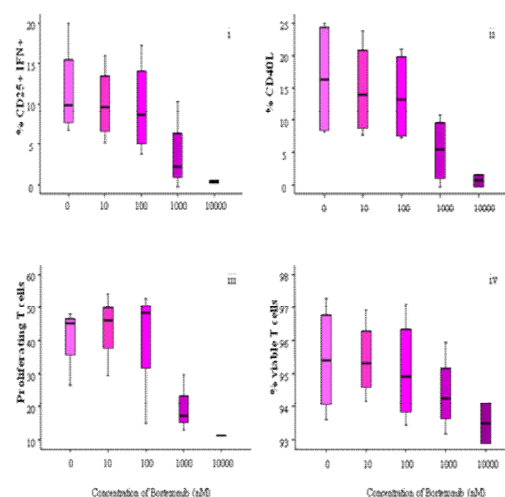


Figure 1B

Figure 1B: Box-plot showing the dose-dependent effect of bortezomib on T-cell activation (i,ii), proliferation (iii) and

viability (iv). Its effect was not significant for doses ≤ 100 nM for any of the parameters considered.

As shown in figure 2, bortezomib and sirolimus synergistically inhibited activation as assessed by the expression of CD25 and production of IFN γ (figures 2A and 2B) and expression of CD40L (figure 2C), and proliferation assessed as expression of PKH (figure 2D). These effects could not be attributed to a decreased viability of T-cells at the concentrations evaluated, as shown in figure 3.

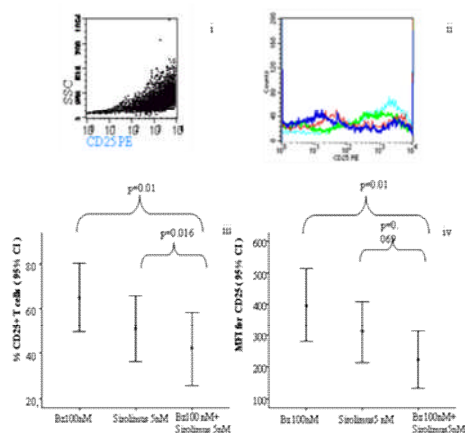


Figure 2A

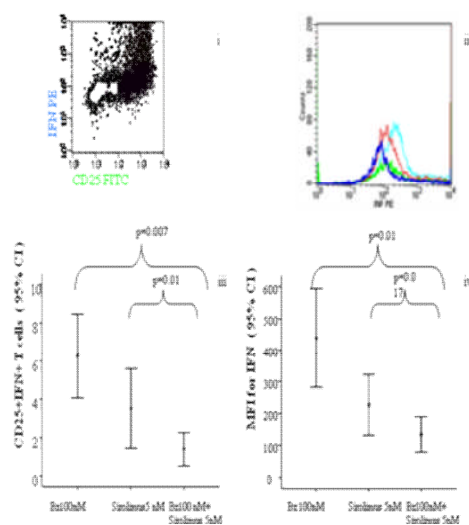


Figure 2B

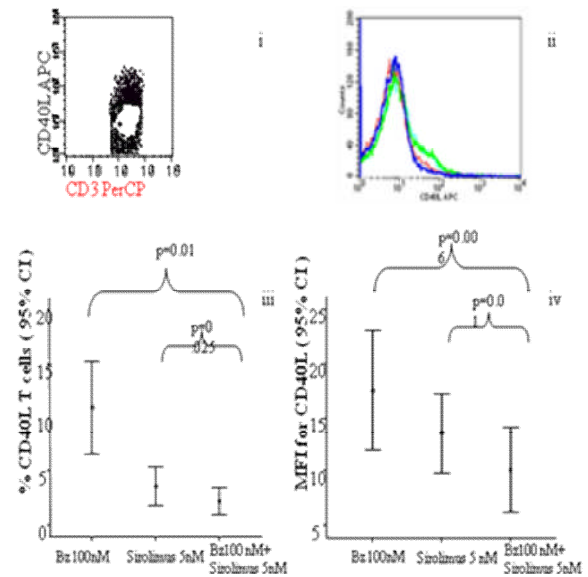


Figure 2C

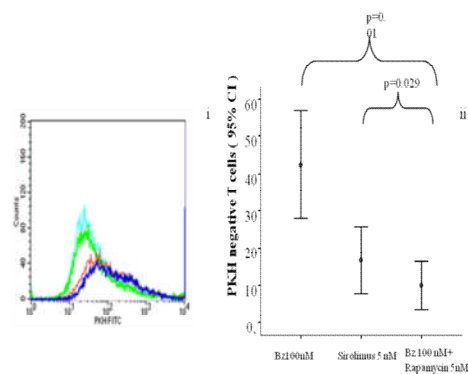


Figure 2D

Figure 2: Concentrations of sirolimus (0.5 and 5 nM) and bortezomib (100 nM) that did not significantly affect activation, proliferation and viability of T-cells were used to evaluate the synergistic effect of the two drugs.

- (A) T-cell activation assessed as the percentage of CD25+ cells (i) and mean fluorescence intensity (ii) of CD25. Figures showing the effect of bortezomib and sirolimus alone or in combination on T-cell activation, assessed as the percentage of CD25+ cells (iii) and as the mean fluorescence intensity (MFI) of CD25 (iv).
- (B) Similar figures as shown in A for T-cell activation, assessed as the percentage of CD25+ IFN γ T-cells and MFI for IFN.
- (C) Similar figures as shown in A for T-cell activation assessed as the percentage of CD40L T-cells and MFI of CD40L.
- (D) T-cell proliferation assessed as the MFI of PKH (i), and box-plot showing the effect of bortezomib and sirolimus alone or in combination on T-cell proliferation.

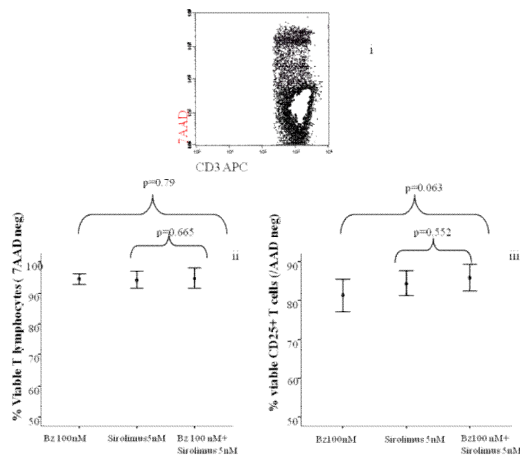


Figure 3

Figure 3: Dot-plot showing T-cell viability, as assessed by 7-AAD staining among T-cells (i). Effect of bortezomib 100 nM, sirolimus 5 nM, or the combination on resting (ii) and activated T-cells (iii). No significant differences were observed.

Effect of sirolimus and bortezomib on the cytokine pattern:

We next analyzed the effect of the drugs, either separately or in combination, on the cytokine pattern of T-cells stimulated with antiCD3 plus antiCD28. As shown in figures 4A and 4B again the combination showed a synergistic effect decreasing the production of Th1 cytokines (IFN γ , IL-2 and TNF), while regarding TH2 cytokines, only IL-6 significantly decreased upon combining the two drugs.

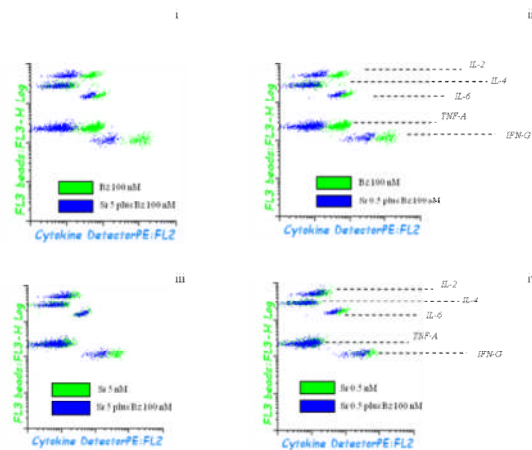


Figure 4A

Figure 4A: CBA cytokine assays in supernatants after four days of T-cell culture in the presence of sirolimus or bortezomib, either separately or in combination. CBA assays using bortezomib at 100 nM alone or in combination with sirolimus at 5 nM (i) or 0.5 nM (ii). CBA assays using sirolimus at 5 nM alone or in combination with bortezomib at 100 nM (iii) or sirolimus at 0.5 nM, alone or in combination with bortezomib at 100 nM.

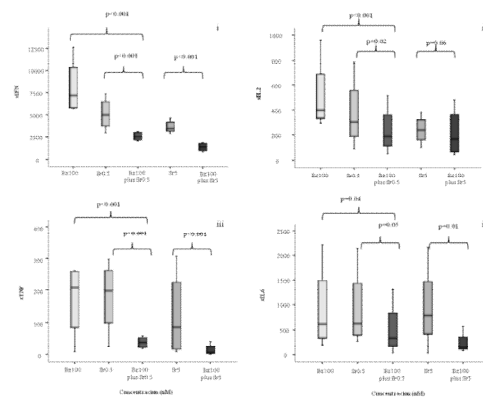


Figure 4B

Figure 4B: Box-plots showing the synergistic effect of the drugs on the production of Th1 cytokines: INF (i), IL-2 (ii), and TNF (iii). Regarding Th2 cytokines, only IL-6 (iv) significantly decreased with the combination of both drugs.

Mechanisms involved in the sirolimus and bortezomib synergism:

In order to explore the mechanisms involved in the synergistic effect of sirolimus and bortezomib western blot assays were performed to identify pathways involved in T-cell activation and proliferation, such as pAkt and pErk. As shown in figure 5, sirolimus at a concentration of 5 nM inhibited phosphorylation of both Akt and Erk, while at 100 nM bortezomib had no effect on phosphorylation. The combination of the two drugs resulted in a blockade of the activation of both pathways, indicating that sirolimus inhibits pathways that could allow T-cells to avoid the effect of bortezomib at the doses used in the current experiment.

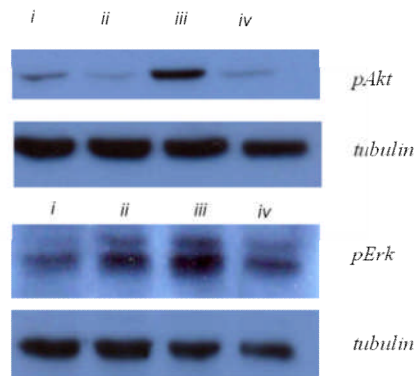


Figure 5

Figure 5: Western blot assays for pAkt and pErk in Jurkat T-cells stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 (i) untreated, or treated with (ii) sirolimus 5nM, (iii) bortezomib 100 nM and (iv) sirolimus 5 nM plus bortezomib 100 nM.

In vivo studies: sirolimus plus bortezomib prevents GVHD

To confirm the synergistic effect of sirolimus and bortezomib *in vivo*, a GVHD mouse model was developed. Mice received bone marrow (5×10^6 cells) with or without 5×10^6 splenocytes. Additionally, either sirolimus at a dose of $0.25 \mu\text{g}/\text{kg}$ intraperitoneally on days 0 to 12 post-transplant, or bortezomib at a dose of $1 \mu\text{g}/\text{day}$ intravenously on days 0, 1 and 2 post-transplant or the combination of both drugs was administered to mice receiving splenocytes. As shown in figure 6A, the addition of bortezomib increased survival relative to mice receiving bone marrow plus splenocytes. Sirolimus further improved survival while the best results were obtained upon adding both drugs. Also, as shown in figure 6B, GVHD signs significantly improved in the group of mice receiving both drugs compared with those receiving either drug separately. In order to better determine the effect of the combination of sirolimus and bortezomib on survival a severe GVHD model was established using 10×10^6 splenocytes. Figure 6A shows that survival was significantly better in the group receiving both drugs, thus confirming *in vivo* the results previously shown *in vitro*. Finally we investigated whether sirolimus had a similar synergistic effect when used in combination with Cyclosporine A at $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ on days 0 to 12 post-transplant. As shown in figure 6C, CsA marginally improved survival relative to controls, and the combination of sirolimus plus CsA offered no significant improvement in survival.

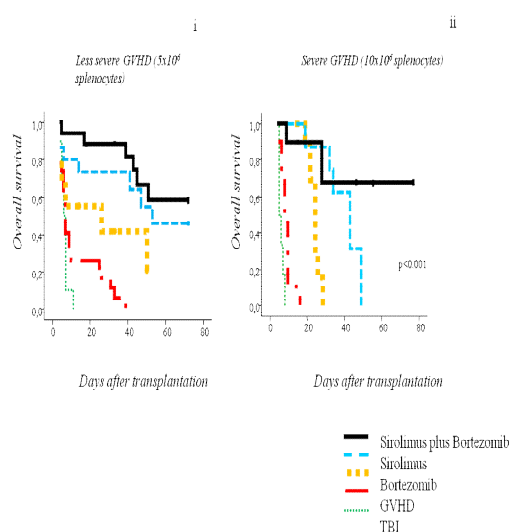


Figure 6A

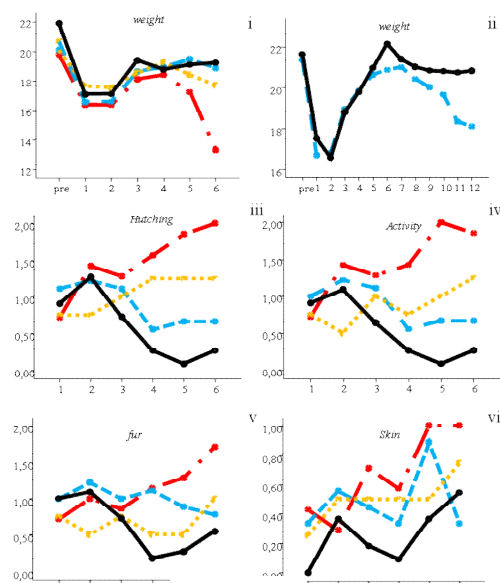


Figure 6B

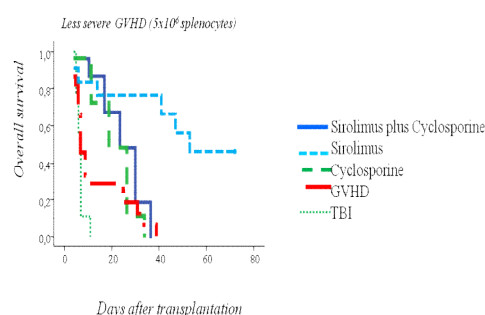


Figure 6C

Figure 6: GVHD mouse model.

(A) Kaplan-Meier curves representing overall survival of mice after a dose of 5×10^6 (i) or 10×10^6 splenocytes (ii) treated with or without sirolimus at a dose of $0.25 \text{ mg}/\text{kg}$, intraperitoneally, for 14 days, bortezomib at a dose of $1 \mu\text{g}$ intravenously on days 0, +1, +2 post-transplant, or the combination of the two drugs. Control groups receiving only splenocytes without any additional drug, or receiving irradiation without stem cell support are shown.

(B) evolution of weight loss during the first 6 (i) or 12 times after transplant (ii), hunching (iii), activity (iv), fur texture (v) and skin integrity (vi) among mice receiving a dose of 5×10^6 splenocytes, with or without the drugs.

(C) Kaplan-Meier curves representing overall survival in mice receiving a dose of 10×10^6 splenocytes, with or without sirolimus, cyclosporine or their combinations. The group receiving only sirolimus had the best outcome, so no beneficial effect was observed upon using the combination.

In vivo studies: graft-versus-leukemia without graft-versus-host disease

We also wanted to evaluate whether the immunosuppressive effect of the combination was unspecific or, by contrast, if it allowed the induction of specific immune

tolerance against host while maintaining the immune response against other antigens. For this purpose we infused NOD-SCID mice with 5×10^6 bone marrow cells plus 5×10^6 splenocytes from BALB/c mice that had previously received a transplant from C57BL/6 using GVHD prophylaxis with sirolimus and bortezomib and had not developed GVHD. All these BALB/c mice showed 100% C57BL/6 hematopoiesis. Interestingly, all NOD-SCID mice died due to GVHD while, as mentioned above, none of the donors had previously developed GVHD it. This implies that the graft had specific immune tolerance against BALB/c but, otherwise, was able to develop an alloimmune response against histocompatibility antigens from third-party mice. To further confirm that the combination of sirolimus plus bortezomib inhibited GVHD, thereby enabling the maintenance of the immune response, we infused WEHI (myelomonocytic leukemic cells) into BALB/c after total body irradiation. We observed that, although all BALB/c mice receiving WEHI plus C57BL/6 donor BM cells died due to leukemic infiltration, none of those receiving WEHI cells plus C57BL/6 donor BM cells plus splenocytes and GVHD prophylaxis with sirolimus and bortezomib developed leukemic infiltration. Therefore this approach enabled us to separate the GVHD and GVL effects (figure 7).

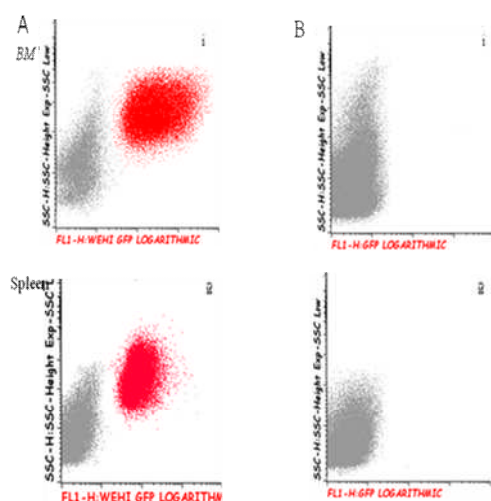


Figure 7

Figure 7: (A) Dot-plots showing bone marrow (i) and spleen (ii) from BALB/c mice receiving 5×10^4 WEHI cells transfected with GFP together with 5×10^6 C57BL/6 BM cells after total body irradiation (controls). (B) The same figures from bone marrow (i) and spleen (ii) of BALB/c mice receiving 5×10^4 WEHI cells plus 5×10^6 C57BL/6 BM cells together with 5×10^6 C57BL/6 splenocytes and 0.25 mg/kg sirolimus intraperitoneally for 14 days, plus 1 µg bortezomib intravenously on days 0, +1 and +2 post-transplant as GVHD prophylaxis. Samples were obtained 4 weeks after transplantation.

Discussion

The combination of MTX plus calcineurin inhibitors has been widely used since the early preclinical studies conducted in the 1980s^(29,30) and it is still considered the gold standard for GVHD prophylaxis. Nevertheless, this combination is far from ideal. It induces numerous side effects, must be maintained for long periods and, most importantly, is not effective in a significant number of patients, since they finally develop GVHD. Attempts to improve this approach have met with only equivocal success^(31,32) In this regard, strategies based on *in vitro* or *in vivo* T-cell depletion have enabled the risk of GVHD to be reduced but it does not improve survival because of an increased risk of relapse and severe infections. Thus, strategies that could reduce the incidence of GVHD without hampering GVL is an unmet medical need that needs to be resolved urgently.

Other drugs have emerged, such as sirolimus, that have yielded promising results *in vitro* and *in vivo*. Indeed, several studies have shown that sirolimus expands regulatory or suppressive T-cells^(16,17) *in vitro*, which could induce tolerance after allogeneic transplantation. On the other hand, clinical trials⁽¹³⁾ have reported improved overall survival in patients receiving sirolimus plus tacrolimus, although a significant proportion of patients still develop GVHD. One of the major problems with sirolimus is its toxicity profile in combination with calcineurin inhibitors, including the development of microangiopathy or veno-occlusive disease, especially among patients receiving myeloablative conditionings^(33,34).

We have previously reported that bortezomib induces selective depletion of alloreactive T-cells⁽²⁵⁾, while Treg are resistant to this pro-apoptotic effect. Furthermore, bortezomib allows the expansion of a suppressive T-cell subpopulation *in vitro*⁽²⁷⁾. In this context, and bearing in mind that sirolimus and bortezomib target different pathways that could synergistically affect T-cell function, in the current study we combined both drugs and confirmed the existence of a very potent synergistic effect in terms of inhibition of both activation and proliferation of T-cells. This effect is not due to increased apoptosis but to a genuine immune-modulatory effect when the two drugs are used in combination, as shown by the effect on the cytokine secretion pattern of stimulated T-cells. Interestingly, Th1 cytokines were strongly affected by the combination, while Th2 cytokines, with the exception of IL-6, were preserved. This combination may also

inhibit the chronic active antibody-mediated rejection that occurs in experimental renal transplantation in the rat⁽³⁵⁾ and could suppress activation of rapamycin-resistant memory T-cells⁽³⁶⁾. The current study not only confirms the synergy of sirolimus plus bortezomib in a fully mismatched hematopoietic stem cell transplant model, but also shows that it yields better results than those with the classical combination of sirolimus plus calcineurin inhibitors, which is currently used in the clinical setting. Improvements in survival using sirolimus plus bortezomib were related to a significant decrease in the risk of GVHD but, most importantly, we confirmed that this strategy enabled GVHD to be avoided in the host but preserved the immune response against third-party mice and, remarkably, maintained the graft-versus-tumor effect without graft-versus-host disease arising.

When we explored the pathways that might account for this synergy, we observed that, at doses of 5 nM of sirolimus and 100 nM of bortezomib, the former inhibited Erk and Akt phosphorylation, while this effect was not observed for bortezomib. The combination of the two drugs significantly inhibited the phosphorylation of both pathways. This is an important finding since these pathways are known to be involved in the resistance of different tumor cells to the action of proteasome inhibitors, and indicates that sirolimus could efficiently block these escape pathways. Shi Y et al.⁽³⁷⁾ have reported that the use of sirolimus may lead to the increased expression of pAkt in tumor cell lines, which could favor resistance to the pro-apoptotic effect of proteasome inhibitors. Contrary to these findings, we found no increase in Akt phosphorylation in primary T-cells upon using sirolimus.

In conclusion, the current study reveals the existence of a potent synergistic effect between sirolimus and bortezomib in terms of inhibition of T-cell activation and proliferation, with a marked decrease in the secretion of Th1 cytokines. These effects are at least partly mediated by the blockade of the Akt and Erk pathways. Finally, this combination enabled the prevention of GVHD while maintaining the GVL effect. On the basis of these findings, a clinical trial using sirolimus plus bortezomib post-transplant is planned.

Authorship: T. Caballero-Velazquez: performed research, analyzed data, and wrote the paper. LI. Sanchez-Abarca: performed research, analyzed data, and wrote the paper. B. Blanco: performed research and wrote the paper. Carmen Herrero: contributed vital new reagents or analytical tools. S. Gutierrez-Cosio: contributed vital new reagents or analytical tools. S. Carrancio: contributed vital new reagents or analytical tools. C. Serrano: performed research. C. del Cañizo: contributed vital new reagents or analytical tools.

J.F. San Miguel: contributed vital new reagents or analytical tools and corrected manuscript. JA Pérez-Simón: designed research, analyzed data, and wrote the paper.

References

1. Sorror ML, Leisenring W, Deeg HJ, Martin PJ, Storb R. Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:814-5.
2. Nash RA, Antin JH, Karanes C, et al. Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood.* 2000; 96:2062-8.
3. Pérez-Simón JA, Encinas C, Silva F, et al. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: the national institutes health scale plus the type of onset can predict survival rates and the duration of immunosuppressive therapy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008; 14:1163-71.
4. Stewart BL, Storer B, Storek J, et al. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. *Blood.* 2004; 104:3501-6.
5. Coenen JJ, Koenen HJM, Van Rijssen E, Hilbrands LB, Joosten I. Rapamycin, and not Cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood.* 2006; 107:1018-23.
6. Segundo D, Ruiz JC, Izquierdo M, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2006; 82:550-57.
7. Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Transplantation.* 2006; 82:1484-92.
8. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, et al. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of

- CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T cells. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:537-45.
9. Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant.* 2007; 7:1722-32.
 10. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, et al. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:1007-18.
 11. Finke J, Behge WA, Schmoor C, Et al. ATG fresenius Trial Group. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10:855-64.
 12. Bacigalupo A, T. Lamparelli, G. Milone, et al. Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). Pre-emptive treatment of acute GVHD: a randomized multicenter trial of rabbit anti-thymocyte globulin, given on day+7 after alternative donor transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45:385-91.
 13. Cutler C, Li S, Ho VT, Koreth J, Alyea E, Soiffer RJ, Antin JH. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* 2007; 109:3108-14.
 14. Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, et al. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;105:2527-34.
 15. Vaysberg M, Balatoni CE, Nepomuceno RB, Krams SM, Martinez OM. Rapamycin inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas through modulation of cell-cycle protein expression. *Transplantation.* 2007; 83:1114-21.
 16. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs-Hoeck J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol.* 2006;177:8338-47.
 17. Uss E, Yong SL, Hooibrink B, van Lier RA, Ten Berge IJ. Rapamycin enhances the number of alloantigen-induced human CD103+CD8+ regulatory T cells in vitro. *Transplantation.* 2007;83:1098-106.
 18. Zeiser R, Leveson-Gower DB, Zambricki EA, et al. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood.* 2008;111:453-62.
 19. Fortin MC, Raymond MA, Madore F, et al. Increased risk of thrombotic microangiopathy in patients receiving a cyclosporine-sirolimus combination. *Am J Transplant.* 2004;4: 946-52.
 20. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:472-84.
 21. Blaha P, S. Bigenzahn, Z. Koporc, et al. The influence of immunosuppressive drugs on tolerance induction through bone marrow transplantation with costimulation blockade. *Blood.* 2003;101:2886-93.
 22. Hideshima T, P. Richardson, D. Chauhan, V. Palombella, E. Elliot, J. Adams, K. Anderson. 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research.* 61:3071-76
 23. Palombella V, Rando O, Goldberg A, Maniatis T. The ubiquitin proteasome pathway is required for processing the NF-kB1 precursor protein and the activation of NF-kB. *Cell.* 1994;78:773-785.
 24. Li B, Q. Dou. Bax degradation by the ubiquitin / proteasome dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2000;97:3835-55.
 25. Blanco B, Pérez-Simón JA, Sánchez-Abarca LI, et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood.* 2006; 107:3575-83.
 26. Koreth J, Stevenson KE, Kim HT, et al. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors. *Blood.* 2009;114:3956-9.
 27. Blanco B, JA. Perez-Simón, LI. Sánchez-Abarca, et al. Treatment with bortezomib of human CD4+ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct

- suppressor T-cell population. *Haematol.* 2009;94:975-83.
28. Cooke KR, Kobzik L, Martín TR, et al. An Experimental Model of Idiopathic Pneumonia Syndrome After Bone Marrow Transplantation: I. The Role of Minor H Antigens and Endotoxin. *Blood.* 1996;8: 3230-3239
 29. Deeg HJ, Storb R, Weiden PL, et al. Cyclosporin A and methotrexate in canine marrow transplantation: engraftment, graft-versus-host disease, and induction of intolerance. *Transplantation.* 1982;34:30-35
 30. Storb R, HJ. Kolb, HJ. Deeg, et al. Prevention of graft-versus-host disease by immunosuppressive agents after transplantation of DLA-nonidentical canine marrow. *Bone Marrow Transplant.* 1986;1:167-177.
 31. Storb R, HJ. Deeg, J. Whitehead, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis for leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1986;314:729-735
 32. Storb R, Deeg HJ, Farewell V, et al. Marrow transplantation for severe aplastic anemia: Methotrexate alone compared with a combination of methotrexate and cyclosporine for prevention of acute graft-versus-host disease. *Blood.* 1986;68:119-125.
 33. Cutler C, Stevenson K, Kim HT, et al. Sirolimus is associated with veno-occlusive disease of the liver after myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2008;112:4425-31.
 34. Rodriguez R, Nakamura R, Palmer JM, et al. A phase II pilot study of tacrolimus/sirolimus GVHD prophylaxis for sibling donor hematopoietic stem cell transplantation using 3 conditioning regimens. *Blood.* 2010;115:1098-105.
 35. Vogelbacher R, Meister S, Gückel E, et al. Bortezomib and sirolimus inhibit the chronic active antibody-mediated rejection in experimental renal transplantation in the rat. 2010. [Epub ahead of print]
 36. Kim JS, JI. Lee, Shin JY, et al. Bortezomib can suppress activation of rapamycin-resistant memory T cells without affecting regulatory T-cell viability in non-human primates. *Transplantation.* 2009;27;88:1349-59.
 37. Shi Y., Yan H, Frost P, Gera J, and Lichtenstein A. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:1533-40.

6. DISCUSIÓN

La EICH es la principal causa de morbi-mortalidad post-trasplante. La profilaxis más habitualmente empleada durante los últimos 30 años se basa en el uso de inhibidores de CaN asociada a MTX (130). Esta combinación continúa siendo la terapia estándar en la actualidad a pesar de su baja efectividad, los numerosos efectos secundarios y la necesidad de ser mantenida durante un largo periodo de tiempo sin que permita generar una respuesta inmuno-tolerante a largo plazo. La depleción T supone a priori una opción interesante, dado el papel central de los linfocitos T en la fisiopatología de la EICH. Sin embargo, a pesar de su eficacia a la hora de disminuir la incidencia de EICH, la depleción inespecífica de linfocitos T incrementa el riesgo de recaídas e infecciones postrasplante.

Los linfocitos Treg y las CD₄ juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis y el control de la respuesta inmune en condiciones basales y, además, diversos estudios han demostrado una correlación entre el número de Treg CD₄⁺CD₂₅⁺FoxP₃⁺ y el riesgo de aparición de EICH (72, 178, 179). Por otro lado las CD₄ desempeñan un papel fundamental en el desencadenamiento de la respuesta inmune alogénica post-trasplante, lo que contrasta con el hecho de que en situación basal o inactiva, sean capaces de modular la respuesta inmune y favorecer el desarrollo de una respuesta anérgica frente a los antígenos presentados en esa situación.

Finalmente, el bortezomib es un inhibidor del proteosoma, capaz de inducir apoptosis de linfocitos alorreactivos (174), propiedad que se ha utilizado ya con éxito en modelos animales (175) e incluso en algunos ensayos clínicos para prevenir la EICH (177).

En el presente trabajo de tesis hemos evaluado la acción del bortezomib sobre los linfocitos Treg en comparación con los linfocitos T convencionales y sobre las CDs, así como el efecto sinérgico de este fármaco en combinación con sirolimus con el fin de explorar nuevas alternativas de tratamiento / profilaxis de EICH.

En el primer capítulo ponemos de manifiesto que el bortezomib no afecta a la viabilidad de los Treg, al contrario de lo que ocurre con los linfocitos T alorreactivos (174). Esta resistencia de los Treg abre la posibilidad de emplear el bortezomib para obtener *in vitro* linfocitos con características de linfocito T regulador/supresor, de manera similar a lo que se ha descrito con sirolimus (61,62), fármaco que ha demostrado su eficacia en numerosos ensayos clínicos. En este sentido, tras el cultivo de linfocitos en presencia de bortezomib podemos distinguir tres subpoblaciones de linfocitos T CD4+: la primera CD25-FOXP3-CD127-, esto es, linfocitos que probablemente han tornado a estado de reposo, una segunda población con fenotipo de células Treg naturales (CD25+FoxP3+CD127-) y una tercera población que se expande de manera significativa en presencia del fármaco que es CD25+FoxP3+/- con expresión variable de CD127. Aunque el porcentaje de células Treg se mantiene tras el cultivo sin un incremento significativo, en los estudios funcionales, estos linfocitos T CD4+ tratados con bortezomib son capaces de disminuir la producción de INF γ y la expresión de CD40L de linfocitos T efectores estimulados con anti-CD3/anti-CD28. Para comprobar si esta capacidad supresora es secundaria a la población de células CD25+FoxP3+/-, nos planteamos el mismo estudio con linfocitos T CD4+CD25-, es decir, partimos de una población deplecionada de Treg. Los resultados obtenidos fueron superponibles a los observados con linfocitos T CD4+ no deplecionados de Treg. Por lo tanto, el cultivo con bortezomib permite obtener una población de linfocitos T diferentes de los Treg con capacidad supresora. Estos linfocitos tienen una expresión

intermedia de FOXP3, de hecho, se ha demostrado como FOXP3 puede no ejercer un papel fundamental para la capacidad funcional de los linfocitos Treg generados *ex vivo* (180,181). Numerosos estudios previos en modelos murinos han demostrado que la infusión de Treg en el contexto del trasplante de MO protege a los animales frente a la EICH (182-184); sin embargo, el problema para exportar este concepto a la clínica es que la cantidad de Treg circulantes es muy bajo y por tanto es técnicamente difícil obtener una cantidad suficiente de estas células. Por otra parte, los intentos de expandir Treg *in vitro* se han visto limitados porque los métodos de expansión finalmente provocan una intensa proliferación de linfocitos T convencionales que contaminan el producto haciendo inviable esta estrategia. Por tanto, la expansión en presencia de bortezomib evitaría la contaminación de linfocitos convencionales permitiendo la expansión de poblaciones de linfocitos T con capacidad supresora

Como conclusión a este primer capítulo, podemos establecer el fundamento del uso del bortezomib en el contexto del trasplante alogénico tanto *in vivo*, al preservar la viabilidad de los Treg, como *in vitro*, al permitir la expansión de poblaciones de linfocitos T con funciones supresoras.

En el segundo capítulo, exploramos el efecto del bortezomib sobre la maduración o activación de las CD8. La depleción de CD8 en el huésped se ha relacionado con un menor riesgo de EICH tras trasplante alogénico (30). En el presente trabajo hemos podido comprobar que el bortezomib induce apoptosis de las CD8 cultivadas en presencia de TNF α y LPS, es decir, en condiciones de activación. Por otra parte, se ha descrito que las CD8 en situación basal se encuentran en un estado inactivo o inmaduro, y no expresan moléculas co-estimuladoras (16,23,185). El contacto con estas CD8 inmaduras genera una respuesta anérgica en los linfocitos T frente a los

antígenos presentados por las CD, mecanismo implicado en la tolerancia periférica (24). En este sentido, Jonuleit y col. (186) demostraron que la estimulación de forma repetida con CD da lugar a la expansión de linfocitos T alorreactivos, mientras que si esta estimulación se realiza con CD en estado inmaduro se inhibe tanto la proliferación de linfocitos como la producción de citoquinas IL-2, IL-4 e IFN α . En el contexto del trasplante alogénico, la quimioterapia de acondicionamiento y el daño tisular generado inducen una maduración funcional de las CD del huésped (187), favoreciendo así el desarrollo de EICH (29). En el presente trabajo de tesis maduramos *in vitro* las CD con TNF α y LPS con el fin de reproducir *in vitro* la situación que tiene lugar tras trasplante y comprobamos que el bortezomib induce en las CD una disminución en la expresión de las moléculas coestimuladoras y de los marcadores de maduración como son CD80, CD40, CD83 y CD86. Diversos estudios previos han demostrado que el bloqueo en la expresión de estas moléculas a nivel de las CD da lugar a una respuesta anérgica en los linfocitos T (188). Pues bien, confirmamos que el bortezomib bloquea la maduración de las CD y que los linfocitos T cultivados con CD tratadas con el fármaco no se activan correctamente al ser re-estimulados con CD del mismo donante. En este mismo experimento comprobamos que las CD cultivadas en presencia de bortezomib inducen una respuesta tolerogénica en los linfocitos T, observable una disminución de los niveles de IL-2 e IFN α y un incremento de IL-10. En este sentido las citoquinas Th1 se relacionan con el desarrollo de EICH aguda mientras que la IL-10 favorece la producción de Treg (189). Respecto a este patrón de citoquinas, es importante mencionar que Hutchings y col (190) han descrito como un incremento precoz de IL-10 junto con niveles reducidos de IL-2 e IFN α en primates da lugar a una respuesta inmunotolerante. En nuestro estudio observamos también que linfocitos T expuestos a CD tratadas con bortezomib muestran características de Treg, tanto por el patrón de citoquinas como por el incremento de expresión de FoxP3.

Finalmente, otros agentes como IL-10, TGF β , glucocorticoides, péptido intestinal vasoactivo o la vitamina D3 (31, 32, 186, 188, 191-193) inhiben también la activación de las CDs. Pues bien, a través de diversos mecanismos la mayoría de estos agentes finalmente bloquean la transcripción al núcleo de NF-kB, de manera similar al mecanismo de acción del bortezomib. Al igual que las citoquinas o fármacos anteriormente mencionados, Tas y col. ponen de manifiesto que la enzima indolamina 2-3 dioxigenasa, que interviene en la metabolización del triptófano y se ha relacionado con la generación de tolerancia inmunológica, actúa también a través de la vía de señalización de NFkB (194). De acuerdo con nuestros resultados la actividad IDO no se modifica en las CDs tratadas con bortezomib

En resumen, el bortezomib induce apoptosis en las CDs y modifica el patrón de maduración y secreción de citoquinas de las CDs, favoreciendo una respuesta tolerogénica de los linfocitos T. Esta propiedad permite promover inmunotolerancia en el contexto del trasplante alogénico.

En tercer lugar, en base a los estudios previos, nos planteamos una nueva estrategia de profilaxis de EICH capaz de generar una respuesta inmunotolerante en lugar de inmunosupresora, de modo que pudiera evitar la EICH sin eliminar el efecto de injerto contra leucemia. En este sentido, diversos estudios han demostrado la capacidad del sirolimus, para expandir Treg o linfocitos T con funciones supresoras (61-63). Por otro lado, numerosos ensayos clínicos han mostrado la eficacia de este fármaco para disminuir el riesgo de EICH, aunque su perfil de toxicidad (MTAT o enfermedad venooclusiva) no es desdeñable. Todo lo anterior, unido a que el sirolimus tiene una diana diferente al bortezomib que podría generar un efecto sinérgico, nos condujo a evaluar la combinación de sirolimus y bortezomib. Pudimos comprobar que *in vitro* se produce un

potente efecto sinérgico en términos de inhibición de la activación y proliferación de los linfocitos T. Este efecto no se debe a un incremento en la apoptosis sino a que se origina una respuesta inmuno-moduladora, manifestada por un claro descenso en la secreción de las citoquinas Th1 si bien las citoquinas Th2, a excepción de IL-6, no se vieron afectadas.

En concordancia con nuestros resultados, Vogelbacher y col. (195) han descrito que la combinación de bortezomib y sirolimus disminuye el rechazo crónico mediado por anticuerpos en un modelo experimental de trasplante renal en ratas. Por otra parte, Kim y col (196) han mostrado cómo el bortezomib es capaz de inhibir los linfocitos T de memoria resistentes al sirolimus. Durante la realización de esta tesis pudimos comprobar cómo, *in vivo*, se mantiene el efecto sinérgico de la combinación en cuanto a reducción del riesgo de EICH aguda en un modelo de trasplante murino con incompatibilidad HLA, y además mejora la supervivencia. Esta menor incidencia de EICH se traduce en una mayor supervivencia de los grupos tratados con la combinación de sirolimus-bortezomib. Además, esta disminución de EICH no inhibe la respuesta inmune frente a nuevos antígenos e incluso mantiene el EICL, indicando que esta combinación genera una respuesta inmunotolerante específica frente al receptor.

En relación con los mecanismos de acción implicados, a pesar de que Shi y col. (197) han expuesto que en líneas tumorales de mieloma el tratamiento con sirolimus incrementa la expresión de Akt fosforilado, en nuestros estudios en línea celular de linfocitos T tanto la fosforilación de Akt como de Erk se inhibe al emplear sirolimus. Por el contrario, el bortezomib no muestra ningún efecto mientras que la combinación de las dos drogas inhibe de forma significativa ambas vías de señalización. Por tanto, el sirolimus podría bloquear vías de señalización implicadas en la resistencia de los linfocitos T a la acción de inhibidores del proteosoma.

En resumen, los estudios *in vitro* e *in vivo* confirman que la combinación de bortezomib y sirolimus es eficaz en la profilaxis de EICH y el presente trabajo establece las bases para el desarrollo de un ensayo clínico que evalué la eficacia de esta combinación.

7. CONCLUSIONES

1. Con respecto al efecto del bortezomib sobre los linfocitos T:
 - a. El bortezomib preserva la viabilidad de los linfocitos Treg mientras que tiene un claro efecto citotóxico sobre los linfocitos T activados.
 - b. Un cultivo linfocitario en presencia de bortezomib permite generar una población de linfocitos T CD4+CD25+ con funciones supresoras.
2. Con respecto al efecto del bortezomib sobre la activación y maduración de las CD8:
 - a. El bortezomib favorece la apoptosis y modifica el patrón de maduración y de secreción de citoquinas en las CD8.
 - b. Las CD8 tratadas con el fármaco y cocultivadas con linfocitos T inducen la expresión de marcadores y la producción de citoquinas característicos de Treg
3. Con respecto a la combinación de bortezomib y sirolimus:
 - a. La combinación de bortezomib y sirolimus genera un potente efecto sinérgico en relación con la inhibición de la activación y proliferación linfocitaria
 - b. En el modelo murino, la combinación de bortezomib y sirolimus disminuye el riesgo de EICH, incrementa de este modo la supervivencia sin inhibir el EICL.
 - c. El efecto sinérgico de la combinación de bortezomib y sirolimus se debe en parte al bloqueo de las vías de Akt y Erk.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Santos GW. History of Bone Marrow Transplantation. Clin Haem 1983; 12: 611-39
2. Osgood EE, Riddle MC, Matthews TJ. Aplastic Anemia treated with daily transfusions and intravenous bone marrow; case report. Ann Inter Med 1939; 13:358-359
3. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Robson MJ, Bethard WF, Gaston EO. The role of the spleen in radiation injury and recovery. J Lab Clin Med. 1950;35: 746-70.
4. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med. 1957:491-6.
5. Mathé G, Jammet H, Pendic B, Schwarzenberg L, Duplan JF, Maupin B, Latarjet R, Larrieu MJ, Kalic D, Djukic Z. Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation. Rev Fr Etud Clin Biol 1959;4:226-38.
6. Dausset J. Leuco-agglutinins. IV. Leucoagglutinins and blood transfusion. Vox Sang 1954; 4:190.
7. Dausset J: Iso-leuco-anticorps. Acta Haematol 1958; 20:156
8. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. Lancet. 1968; 28;2:1366-9.
9. Quesenberry PJ, Colvin G, Abedi M: Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond (Review). Exp Hematol 2005; 33:9
10. Thomas ED, Storb R: Technique for human marrow grafting. Blood 1970; 36:507.

11. McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ: Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 1971; 171:293
12. Abrams RA, McCormack K, Bowles C, Deisseroth AB: Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs. *J Clin Invest* 1981; 67:1392
13. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro R, Gravest V, Yoder M, Wagner J, Vadhan-Rajs S, Benninger L, Rubinstein P, Broun R: Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:4109
14. Barnes D, Loutit J. Treatment of murine leukemia with x-rays and homologous bone marrow. *Br J Haematol* 1957; 3:241-252.
15. Appelbaum FR. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* 2001;411:385–389
16. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 685-711
17. Goulmy E, Schipper R, Pool J, et al: Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1996; 334:281.
18. Falkenburg JH, Corput L, Marijt WA, Willemze R. Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2003;31:743.
19. Langerhans, P. «Uber die nerven der menschlichen haut». *Archives of Pathological Anatomy* 1868: 325-337.
20. Steinman R. M., Cohn Z. A. «Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution» (en anglès). *J. Exp. Med.* 1973;137: 1142–62.

21. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 351-8.
22. Fresnay S, Garnache-Ottou F, Plumas J, Seilles E, Tiberghien P, Saas P. Can tolerogenic dendritic cells help to modulate allo-immune responses in the setting of hematopoietic cell transplantation?. *Transplant Immunology* 2003; 11: 259-66.
23. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
24. Reis e Sousa C: Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:476.
25. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 621-7
26. Erlich HA, Opelz G, Hansen J: HLA DNA typing and transplantation. *Immunity.* 2001;14:347.
27. Shlomchik WD: Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:340.
28. Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik D and Shlomchik MJ. Distinct roles for donor and host derived antigen presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft- versus -host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005; 105: 2227-34.
29. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999; 285:412.
30. Chan GW, Gorgun G, Miller KB, Foss FM. Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 170-6.

31. Penna G and Adorini L. 1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of Dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164: 2405-11.
32. Hackstein H, Taner T, Zahorchak A, Morelli A, Logar AJ, Gessner A, and Thomson AW. Rapamycin inhibits IL-4 induced dendritic cell maturation in vitro and dendritic cell mobilization and function in vivo. *Blood* 2003; 101: 4457-63.
33. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105: 2214-9.
34. Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-H, Wu Y, Yu S-X and Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105: 4120-6.
35. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz M, and Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 15: 233-8.
36. Sakaguchi S. Animals models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin. Immunol.* 2000. 12, 684-690.
37. Sakaguchi S, Takahashi T., and Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J. Exp. Med.* 1982. 156, 1577-1586.
38. Fowell D and Mason D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J. Exp. Med.* 1993. 177, 627-636.
39. Sakaguchi, S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M. Immunologic Tolerance maintained by activated T cells expressing IL2 receptor α -chains

- (CD25): breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. 155: 1151-1164.
40. Baecher-Allan, C., Viglietta V and Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin. Immunol.* 2004. 16: 89-98.
41. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 2005. 6, 345-352.
42. Jiang S, Lechler RI, He XS, Huang JF. Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Hum Immunol* 2006;67:765-76.
43. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61
44. Cozzo C, Larkin J, III, Caton AJ. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171:5678-82.
45. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 2003;4, 337–342.
46. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003;4, 330–336.
47. Brunkow, ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27, 68-73.
48. Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev.* 2005;203:156-64.
49. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192:295-302.

50. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002;3:135-42.
51. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-23.
52. Malek TR, Bayer AL. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol.* 2004 Sep;4(9):665-74.
53. Nelson BH. IL-2, regulatory T-cell, and tolerance. *J Immunol* 2004; 172:3983-8
54. Furtado G, de Lafaille MAC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin-2 signaling is required for CD4+ regulatory T-cell function. *J Exp Med* 2002; 196:851-7.
55. Thornton A, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 2004; 172:6519-23.
56. Nelson BH, McIntosh BC, Rosencrans LL, Greenberg PD. Requirement for an initial signal from the membrane-proximal region of the interleukin 2 receptor gamma(c) chain for Janus Kinase activation leading to T cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1878-83.
57. Besinger S, Walsh PT, Zhang J, Carroll M, Parsons R, Rathmell JC, Thompson CB, Burchill MA, Farrar MA, Turka LA, Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172:5287-96.
58. Zeiser R, Leveson Gower DB, Zambricki EA, Kambham N, Beihack A, Loh J, Hou JZ, Negrin RS. Differential impact of mTOR inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells as compared to conventional CD4+ T cells. *Blood* 2008; 111: 453-462.

59. Crellin NK, Garcia NV, Levings MK. Altered activation of Akt is required for the suppressive function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *Blood* 2006; 109:2014-22.
60. Walsh P, Buckler JL, Zhang J, Gelman AE, Dalton NM, Taylor DK, Besinger SJ, Hancock WW, Turka LA. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4 CD25 Tregs. *J Clin Invest* 2006; 116:2521-31
61. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005; 105:4743-8.
62. Battaglia M, Stabilini A, Migliavacca B, Horejs J, Kaupper T, Roncarolo MG. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 2006; 117:8338-47.
63. Valmori D, Tosello V, Souleimanian NE, Godefroy E, Scotto L, Wang Y, Ayyoub M. Rapamycin-Mediated Enrichment of T Cells with Regulatory Activity in Stimulated CD4 T Cell Cultures Is Not Due to the Selective Expansion of Naturally Occurring Regulatory T Cells but to the Induction of Regulatory Functions in Conventional CD4 T Cells. *J Immunol* 2006; 177:944-9.
64. Uss E, Yong SL, Hooibrink B, van Lier RA, Ten Berge IJ. Rapamycin enhances the number of alloantigen-induced human CD103+CD8+ regulatory T cells in vitro. *Transplantation*. 2007;83:1098-106.
65. Frank D, Robertson MJ, Bonni A, Ritz J, Greenberg ME Interleukin 2 signaling involves the phosphorylation of Stat proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7779-83.
66. Murawski MR, Litherland SA, Clare Salzler MJ, Davoodi Semiromi A. Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5

- dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1079:198-204.
67. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, and Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T-cell subset. I Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance: deficit of a T-cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1985. 161, 72-87.
68. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003; 9:1144.
69. Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS, Ho L, Kambham N, Bachmann M, Brown JM, Negrin RS. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 2007; 109:264
70. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versushostdisease lethality. *Blood* 2002;99:3493-9.
71. Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, Fietz T, Wolff D, Terpe H, et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006; 107:1717-23.
72. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3+CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versushost disease. *Blood* 2005;106:2903-11.
73. Fernando Macian. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology.* 2005: 5, 472-484.

74. Masuda E, Imamura R, Amasaki Y, Arai K, Arai N. Signalling into the T-cell nucleus: NFAT regulation. *Cell Signal*.1998;10:599-611.
75. Macian F, Garcia-Cozar F, Im SH, Horton HF, Byrne MC, Rao A. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell*. 2002;109:719-731.
76. Sundstedt A, Sigvardsson M, Leanderson T, et al. In vivo anergized CD4₊ T cells express perturbed AP-1 and NF- κ B transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:979-984.
77. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Rev Immunol* 2007;25:139-170.
78. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966-1967;62:21-78.
79. Korngold R, Sprent J. Purified T cell subsets and lethal graft-versus-host disease in mice. In: Gale RP; Champlin R, editors. *Progress in bone marrow Transplantation*. Alan R. Liss, Inc; New York: 1987.p 213-218.
80. Kernan NA, Collins NH, Juliano LL, Cartagena TT, Dupont BB, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-versus-host disease. *Blood* 1986; 68:770-773.
81. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-956.
82. Pérez-Simón JA, Encinas C, Silva F, Arcos MJ, Díez-Campelo M, Sánchez-Guijo FM, Colado E, Martín J, Vazquez L, del Cañizo C, Caballero D, San Miguel J.

- Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: the national institutes health scale plus the peripheral blood stem cell transplantation: the national institutes health scale plus the type of onset can predict survival rates and the duration of immunosuppressive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:1163-71.
83. Stewart BL, Storer B, Storek J, Deeg HJ, Storb R, Hansen JA, Appelbaum FR, Carpenter PA, Sanders JE, Kiem HP, Nash RA, Petersdorf EW, Moravec C, Morton AJ, Anasetti C, Flowers ME, Martin PJ. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2004 Dec 1;104:3501-6.
84. Lee SJ, Flowers ME. Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:134-41.
85. Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of graft-vs-host disease. En Thomas' *Hematopoietic Cell Transplantation 3rd ed*. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR Editores. Blackwell Publishing USA, pp 353, 2004
86. Matzinger P: The danger model: A renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301.
87. Hill G, Ferrara J. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 2000; 95:2754.
88. Hofmeister CC, Quinn A, Cooke KR, Stiff P, Nickoloff B, Ferrara JL. Graft versus host disease of the skin: life and death on the epithelial edge. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2004;10: 366-72.
89. Theobald M, Nierle T, Bunjes D, Arnold R, Heimpel H. Host specific interleukin-2 secreting donor T cell precursors as predictors of acute graft versus host disease in bone marrow transplantation between HLA identical siblings. *N Eng J Med*. 1992;327:1613-7.

90. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, Lee SJ, Hochberg EP, Wu CJ, Alyea EP, Cutler C, Ho V, Soiffer RJ, Antin JH, Ritz J. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood*. 2005;105:2973-8.
91. Hart B, Kooyk Y. Yin-Yang regulation of autoimmunity by DCs. *Trends in Immunol* 25: 353, 2004
92. Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003;102: 2187-94.
93. Weiss A, Littman D. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1994; 76: 263-74.
94. Werlen G, Palmer E. The TCR signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr Op Immunol*. 2002;14:299-305.
95. Bernard A, Lamy L, Alberti I. The two signal model of T-cell activation after 30 years. *Transplantation*. 2002;73: S31-5.
96. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med*. 2003; 54:29.
97. Esteban JM, Somlo G. Skin biopsy in allogeneic and autologous bone marrow transplantation patients: a histologic and immunohistochemical study and review of the literature. *Mod Pathol* 1995; 8: 59
98. Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft versus host disease. *N Engl J Med* 1991; 324:667.
99. Nevo S, Enger C, Swan V, Wojno KJ, Fuller AK, Altomonte V, Braine HG, Noga SJ, Vogelsang GB. Acute bleeding after allogeneic bone marrow transplantation: Association with graft versus host disease and effect on survival. *Transplantation*. 1999; 67:681-9.

100. Uphoff DE. Alteration of homograft reaction by A-methopterin in lethally irradiated mice treated with homologous marrow. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958;99:651-653.
101. Storb R, Rudolph RH, Thomas ED. Marrow grafts between canine siblings matched by serotyping and mixed leukocyte culture. *J Clin Invest.* 1971;50:1972-1975.
102. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis for leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1986;314:729-735.
103. Sorrow ML, Leisenring W, Deeg HJ, Martin PJ, Storb R. Twenty-year follow-up of a controlled trial comparing a combination of methotrexate plus cyclosporine with cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients administered HLA-identical marrow grafts for leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:814-5.
104. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med.* 1994;331:1110-1115.
105. Storb R, Raff RF, Appelbaum FR, Deeg HJ, Fitzsimmons W, Graham TC, Pepe M, Pettinger M, Sale G, van der Jagt R, et al. FK-506 and methotrexate prevent graft-versus-host disease in dogs given 9.2 Gy total body irradiation and marrow grafts from unrelated dog leukocyte antigen-nonidentical donors. *Transplantation.* 1993;56:800-7.
106. Nash RA, JH. Antin, C. Karanes, JW. Fay, BR. Avalos, AM. Yeager, D. Przepiorka, S. Davies, FB. Petersen, P. Bartels, D. Buell, W. Fitzsimmons, C. Anasetti, R. Storb, V. Ratanatharathorn. Phase 3 study comparing methotrexate

- and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood*. 200;96:2062-8.
107. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, Fay JW, Nademanee A, Antin JH, Christiansen NP, van der Jagt R, Herzig RH, Litzow MR, Wolff SN, Longo WL, Petersen FB, Karanes C, Avalos B, Storb R, Buell DN, Maher RM, Fitzsimmons WE, Wingard JR. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92:2303-14.
108. Zorn E, Erik A. Nelson, Mehrdad Mohseni, Fabrice Porcheray, Haesook Kim, Despina Litsa, Roberto Bellucci, Elke Raderschall, Christine Canning, Robert J. Soiffer, David A. Frank, and Jerome Ritz. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*. 2006; 108: 1571–1579.
109. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. 2006;126:375-387.
110. Ho L, Crabtree G. A Foxy tango with NFAT. *Nat Immunol*. 2006;7:906-908.
111. Wang H, Zhao L, Sun Z, Sun L, Zhang B, Zhao Y. A potential side effect of cyclosporin A: inhibition of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Tranplantation*. 2006;82:1484-1492.
112. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Kasran A, Boon L, Hilbrands LB, Joosten I. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cells. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39:537-45.

113. Coenen JJ, Koenen HJM, Van Rijssen E, Hilbrands LB, Joosten I. Rapamycin, and not Cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood*. 2006; 107:1018-23.
114. Noris M, Casiraghi F, Todeschini M, Cravedi P, Cugini D, Monteferrante G, Aiello S, Cassis L, Gotti E, Gaspari F, Cattaneo D, Perico N, Remuzzi G. Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18:1007-18.
115. Gao W, Lu Y, El Essawy B, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB. Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am J Transplant*. 2007; 7:1722-32.
116. Segundo D, J.C. Ruiz, M. Izquierdo, G. Fernandez Fresnedo, C. Gomez Alamillo, R. Merino, M.J. Benito, E. Cacho, E. Rodrigo, R. Palomar, M. Lopez Hoyos, M. Arias. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2006;82:550-57.
117. Bolwell B, Sobecks R, Pohlman B, Andresen S, Rybicki L, Kuczkowski E, Kalaycio M. A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34:621-5.
118. Vezina, C.; A. Kudelski and SN. Sehgal: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiotics*. 1975;28: 721 -726.
119. Sehgal SN., H. Baker, C. Vezima: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiotics*. 1975; 28: 727-732.

120. Récher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, Chicanne G, Dos Santos C, Mas VM, Benzaquen D, Laurent G, Huguet F, Payrastra B. Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;105:2527-34.
121. Vaysberg M, Balatoni CE, Nepomuceno RB, Krams SM, Martinez OM. Rapamycin inhibits proliferation of Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas through modulation of cell-cycle protein expression. *Transplantation*. 2007; 83:1114-21.
122. Calne, R. Y., D. S. Collier, S. Lin, S. G. Pollard, A. Saman, D. J. White, and S. Thiru.. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet* 1989:227
123. Terada N, Takase K, Papst P, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin inhibits ribosomal protein synthesis and induces G1 prolongation in mitogenactivated T lymphocytes. *J Immunol*. 1995;155: 3418-3426.
124. Blume-Jensen P, Hunter T:Oncogenic Kinase signaling. *Nature* 2001;411:355.
125. Schmelzle T, Hall MN: TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:25.
126. Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N: Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Gen Dev* 2001; 15:807.
127. Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004; 23:3151-3171.
128. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124:471-484.
129. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002; 10:457-468.

130. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110:177-189.
131. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; 110:163-175.
132. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 2003; 11:895-904
133. Wullschleger S, Loewith R, Oppliger W, Hall MN. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem* 2005; 280:30697-30704.
134. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004; 14:1296-1302.
135. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004; **6**:1122-1128.
136. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **307**:1098-1101.
137. Bayascas JR, Alessi DR. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell* 2005; 18:143-145.
138. Hay, N. and Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Dev.* 18: 1926–1945.

139. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 296:1655-1657.
140. Leslie NR, Downes CP. PTEN: the down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal*. 2002;14:285-295.
141. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 2003; 4:257-262.
142. Toker A, Newton AC. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 2000; 103:185-18.
143. Belham C, Wu S, Avruch J. Intracellular signalling: PDK1 – a kinase at the hub of things. *Curr Biol* 1999; 9:R93-R96.
144. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 2002; 4:658-665.
145. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 2002; 4:648-657.
146. Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 2002; 10:151-162.
147. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat. Cell Biol.* 2003;5:578-581.
148. Manning, B.D. and Cantley, L.C. 2007. Akt/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell* 129: 1261–1274.
149. Han C. Dan, Matthew J. Cooper, Patricia C. Cogswell, Joseph A. Duncan, Jenny P.-Y. Ting and Albert S. Baldwin. Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes & Dev.* 2008 22: 1490-1500.

150. Sawyers, C.L. 2003. Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs? *Cancer Cell* 4: 343–348.
151. Cutler C, Li S, Ho VT, Koreth J, Alyea E, Soiffer RJ, Antin JH. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2007 Apr 1;109:3108-14.
152. Fortin MC, Raymond MA, Madore F, Fugère JA, Pâquet M, St-Louis G, Hébert MJ. Increased risk of thrombotic microangiopathy in patients receiving a cyclosporine-sirolimus combination. *Am J Transplant*. 2004;4: 946-52
Bacigalupo A. Antithymocyte globulin for prevention of graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol* 2005; 12: 457-462
153. Cutler C, Stevenson K, Kim HT, Richardson P, Ho VT, Linden E, Revta C, Ebert R, Warren D, Choi S, Koreth J, Armand P, Alyea E, Carter S, Horowitz M, Antin JH, Soiffer R. Sirolimus is associated with veno-occlusive disease of the liver after myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2008;112:4425-31.
154. Rodriguez R, Nakamura R, Palmer JM, Parker P, Shayani S, Nademanee A, Snyder D, Pullarkat V, Kogut N, Rosenthal J, Smith E, Karanes C, O'Donnell M, Krishnan AY, Senitzer D, Forman SJ. A phase II pilot study of tacrolimus/sirolimus GVHD prophylaxis for sibling donor hematopoietic stem cell transplantation using 3 conditioning regimens. *Blood*. 2010;115:1098-105.
155. Blaha P, Bigenzahn S, Koporc Z, Schmid M, Langer F, Selzer E, Bergmeister H, Wrba F, Kurtz J, Kiss C, Roth E, Muehlbacher F, Sykes M, Wekerle T. The influence of immunosuppressive drugs on tolerance induction through bone marrow transplantation with costimulation blockade. *Blood*. 2003;101:2886-93.

156. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhäuser M, Einsele H, Kolb HJ, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socié G; ATG fresenius Trial Group. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10:855-64.
157. Bacigalupo A, Lamparelli T, Milone G, Sormani MP, Ciceri F, Peccatori J, Locasciulli A, Majolino I, Di Bartolomeo P, Mazza F, Sacchi N, Pollicheni S, Pinto V, Van Lint MT; Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). Pre-emptive treatment of acute GVHD: a randomized multicenter trial of rabbit anti-thymocyte globulin, given on day+7 after alternative donor transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45:385-91.
158. Bacigalupo A, Lamparelli T, Barisione G, Bruzzi P, Guidi S, Alessandrino PE, di Bartolomeo P, Oneto R, Bruno B, Sacchi N, van Lint MT, Bosi A; Gruppo Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). Thymoglobulin Prevents Chronic Graft-versus-Host Disease, Chronic Lung Dysfunction, and Late Transplant-Related Mortality: Long-Term Follow-Up of a Randomized Trial in Patients Undergoing Unrelated Donor Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplant* 2006; 12: 560-565
159. Pérez-Simón JA, Kottaridis PD, Martino R, Craddock C, Caballero D, Chopra R, García-Conde J, Milligan DW, Schey S, Urbano-Ispizua A, Parker A, Leon A, Yong K, Sureda A, Hunter A, Sierra J, Goldstone AH, Linch DC, San Miguel JF, Mackinnon S; Spanish and United Kingdom Collaborative Groups for Nonmyeloablative Transplantation. Non-myeloablative transplants with or without

- CAMPATH-1H: comparison between two prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 2002; 100: 3121-7.
160. Hideshima T, P. Richardson, D. Chauhan, V. Palombella, E. Elliot, J. Adams, K. Anderson. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*. 2001;61:3071-76.
161. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: A novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res*. 1999; 59:2615.
162. Adams J: Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist*. 2002;7:9.
163. Naujokat C, Hoffmann S: Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest*. 2002; 82:965.
164. Palombella V, Rando O, Goldberg A, Maniatis T. The ubiquitin proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell*. 1994;78:773-785.
165. Li B, Q. Dou. Bax degradation by the ubiquitin / proteasome dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2000;97:3835-55.
166. Ghosh S, May M, Kopp E. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators to immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-60
167. O'Sullivan B, Thomas R. CD40 ligation conditions dendritic cells antigen-presenting function through sustained activation of NF- κ B . *J Immunol* 2002; 168: 5491-98.
168. Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3: 221-7.

169. Tas SW, de Jong EC, Hajji N, May MJ, Ghosh S, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Selective inhibition of Nf- κ B in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur J Immunol*. 2005; 35: 1164-74.
170. Matsumoto M, Yamada T, Yoshinaga SK, Boone T, Horan T, Fujita S, Li Y, Mitani T. Essential role of NF- κ B inducing kinase in T cell activation through the CDR/CD3 pathway. *J Immunol* 2002; 169: 1151-8.
171. O'Keeffe M, Grumont RJ, Hochrein H, Fuchsberger M, Gugasyan R, Vremec D, Shortman K, Gerondakis S. Distinct roles for the NF- κ B1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 2005; 106: 3457-64.
172. Akira S, Takeda K. Toll like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511.
173. Belén Blanco, José A. Pérez-Simón, Luis I. Sánchez-Abarca, Xonia Carvajal-Vergara, Juan Mateos, Belén Vidriales, Natalia López-Holgado, Patricia Maiso, Mercedes Alberca, Eva Villarón, David Schenkein, Atanasio Pandiella and Jesús San Miguel. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood*. 2006; 107:3575-83.
174. Sun K, Welniak LA, Panoskaltsis-Mortari A, O'Shaughnessy MJ, Liu H, Barao I, Riordan W, Sitcheran R, Wysocki C, Serody JS, Blazar BR, Sayers TJ, Murphy WJ. Inhibition of acute graft versus host disease with retention of graft versus tumor effects by the proteasome inhibitor Bortezomib. *Proc Natl Acad Sci*. 2004; 101: 8120-5.
175. Sun K, Wilkins DE, Anver MR, Sayers TJ, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Welniak LA, Murphy WJ. Differential effects of proteasome inhibition by bortezomib on murine acute graft versus host disease: delayed administration of

- bortezomib results in increased GVHD-dependent gastrointestinal toxicity. *Blood*. 2005; 106: 3293-9.
176. Koreth J, Stevenson KE, Kim HT, Garcia M, Ho VT, Armand P, Cutler C, Ritz J, Antin JH, Soiffer RJ, Alyea EP 3rd. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors. *Blood*. 2009;114:3956-9.
177. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cave H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, Gonzalez M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. **Leukemia**. 2003;17:2318-57.
178. Alegre E, López AS, González A. Tryptophan metabolites interfere with the Ehrlich reaction used for the measurement of kynurenine. *Analytical Biochemistry* 2005; 339: 188-89.
179. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J Jr, Crawford JM, Ferrara JL. An Experimental Model of Idiopathic Pneumonia Syndrome After Bone Marrow Transplantation: I. The Role of Minor H Antigens and Endotoxin. *Blood*. 1996;8: 3230-3239
180. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC, Matsui WH, Arai S, Fuchs EJ, Vogelsang GB, Jones RJ, Hess AD. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004;104:2187-93.

181. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, Keyvanfar K, Montero A, Hensel N, Kurlander R, Barrett AJ. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 2006;108:1291-7.
182. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002;196:1335-46.
183. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. 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* 2004;172:5986-93
184. Hanash AM, Levy RB. Donor CD4+CD25+ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2005;105:1828-36.
185. Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* 2004;103:4216-21.
186. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389-99.
187. Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Iyoda T, Ravetch J, Dhodapkar M, Inaba K, Nussenzweig M. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 987; 15-2.

188. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000; 192: 1213-22.
189. Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, Rivera AJ, Emerson SG. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T-cell mediated acute-graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2002; 109: 1335-44.
190. Jonker M, Ossevoort MA, Vierboom M. Blocking the CD80 and CD86 costimulation molecules: lessons to be learned from animal models. *Transplantation.* 2002; 73: S23-6.
191. de Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol.* 2005; 26: 289-307
192. Hutchings A, Wu J, Asiedu C, Hubbard W, Eckhoff D, Contreras J, Thomas FT, Neville D, Thomas JM. The immune decision toward allograft tolerance in non-human primates requires early inhibition of innate immunity and induction of immune regulation. *Transpl Immunol.* 2003; 11: 335-44.
193. Ichim TE, Zhong R, Min WP. Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol.* 2003; 295-306.
194. Chorny A, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Martin A, Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft versus host disease while maintain graft versus tumor. *Blood* 2006; 107: 3787 - 94.
195. Yamada And A, Sayegh MH. The CD154-CD40 costimulatory pathway in Transplantation. *Transplantation.* 2002; 73: S36-9.
196. Tas SW, Vervoordeldonk MJ, Hajji N, Schuitemaker JH, van der Sluijs KF, May MJ, Ghosh S, Kapsenberg ML, Tak PP, de Jong EC. Noncanonical NF- κ B

- signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood* 2007; 110: 1540-49.
197. Vogelbacher R, Meister S, Gückel E, Starke C, Wittmann S, Stief A, Voll R, Daniel C, Hugo C. Bortezomib and sirolimus inhibit the chronic active antibody-mediated rejection in experimental renal transplantation in the rat. *Nephrol Dial Transplant*. 2010. [Epub ahead of print]
198. Kim JS, Lee JI, Shin JY, Kim SY, Shin JS, Lim JH, Cho HS, Yoon IH, Kim KH, Kim SJ, Park CG. Bortezomib can suppress activation of rapamycin-resistant memory T cells without affecting regulatory T-cell viability in non-human primates. *Transplantation*. 2009;27;88:1349-59.
199. Shi Y., Yan H, Frost P, Gera J, and Lichtenstein A. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther*. 2005;4:1533-40.