

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina.



***“USO DE AGENTES DEMETILANTES EN EL
TRASPLANTE ALOGÉNICO.”***

Silvia Gutiérrez Cosío.

2010



Departamento de Medicina.
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

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

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “USO DE AGENTES DEMETILANTES EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO” realizado por la licenciada Silvia Gutiérrez Cosío 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, firmo la siguiente certificación en Salamanca a 17 de junio de 2010.

Fdo. Dr. Jose Antonio Pérez Simón



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 AGENTES DEMETILANTES EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO” realizado por la licenciada Silvia Gutiérrez Cosío 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, firmo la siguiente certificación en Salamanca a 17 de junio de 2010.

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



Departamento de Medicina.
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

D^a. Belén Blanco Durango, Doctor en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “USO DE AGENTES DEMETILANTES EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO” realizado por la licenciada Silvia Gutiérrez Cosío 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, firmo la siguiente certificación en Salamanca a 17 de junio de 2010.

Fdo. Dra. Belén Blanco Durango

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, con mucho cariño y gran admiración:

La realización de este estudio ha requerido durante mucho tiempo dosis inmensas de trabajo, esfuerzo y la colaboración de muchas personas que me han rodeado y han estado cerca durante estos años. He tenido la oportunidad de conocer la hematología de la mano de grandes profesionales, personas ejemplares, admirables y encantadoras que me han guiado, haciendo que esta etapa haya sido realmente enriquecedora. Al llegar este momento y mirar hacia atrás, veo que todas estas personas son parte activa de este trabajo, han hecho más fáciles los momentos difíciles y para cada uno de ellos solamente tengo palabras de agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. San Miguel porque además de ser un ejemplo como persona y como profesional con su entusiasmo diario transmite energía y ganas de trabajar. También, quiero agradecerle que me haya brindado esta oportunidad.

Con especial cariño al Dr. Pérez Simón por la confianza que desde el primer día depositó en mí, su apoyo, sus ideas, sus consejos, su entusiasmo y su ilusión incansable, que han sido los pilares de este trabajo. Además de ser, una persona admirable.

A la Dra. Blanco por ser una excepcional investigadora, por su cariño, su comprensión, sus nuevos puntos de vista y porque siempre ha estado ilusionada con este trabajo.

De forma especial al Dr. Sánchez-Abarca por ser una excelente persona, por su cariño, su ilusión, su alegría y porque me guió durante y cada uno de los experimentos, con optimismo, dedicación e infinita paciencia.

A la Dra. del Cañizo, por su trayectoria humana y profesional, por aceptarme en su laboratorio, donde la calidad humana estimula el interés por la investigación y donde es un privilegio poder trabajar

Al Dr. Sánchez-Guijo por su humanidad, sus buenos consejos y sus ganas de trabajar.

A la Dra. Díez Campelo porque es una gran hematóloga y una gran maestra, siempre dispuesta a enseñar y a colaborar con nosotros. Además, agradecerle que nos haya

proporcionado las muestras de pacientes, sin las cuales este trabajo no habría sido posible.

Al Dr. Ocio porque sus visitas están llenas de buenos consejos y nuevas ideas que nos contagian de su ilusión y su pasión por la investigación.

Al Dr Ballester y su equipo por sus aportaciones en la realización y análisis de los estudios de metilación de genes.

A Fran por su colaboración y ayuda en los estudios de expresión génica.

A Teresa agradecerle especialmente su ayuda en la realización del modelo *in vivo*.

A Conchi, porque he tendido la oportunidad de trabajar con una amiga, me ha acompañado en cada paso de este trabajo, me ha enseñado y me ha escuchado en los buenos y en los malos ratos.

A Vicen, porque siempre tiene una sonrisa, una respuesta amable y nos ha proporcionado las aféresis de los donantes sanos, imprescindibles para la realización de este estudio.

A Sandra, Sori, Pilar, Carmen, Miri, Rebe, Maru y Bea por ser excepcionales compañeras y amigas, porque han hecho que el laboratorio sea un lugar agradable, donde trabajar sea algo más que la rutina de cada día.

A Carlos por introducirme en el misterioso pero cautivador mundo de la biología molecular.

A Natalia, Eva, Carlos, Olga y Eva Villarón porque siempre tienen algo que aportar.

A Eva, Manu, Teresa, Vero y Luis por su disponibilidad y ayuda.

A mis compañeros de citometría: Wendy, Josito, Carlos, Juan, Bruno y Chema por su cariñosa acogida en su laboratorio, su ayuda y su buen humor que han hecho divertidas y amenas las largas horas de trabajo en el citómetro.

A mis compañeros de biología molecular: Feli, Imma, Montse y Ali por su ayuda y buen recibimiento en el laboratorio.

A Mercedes, Gloria y Maite porque cada día tienen palabras de cariño y siempre me cuidan.

A todos mis compañeros del laboratorio 12 del Centro del Cáncer, siempre dispuestos a compartir su saber con nosotros.

A todos los que forman parte del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca y del Centro del Cáncer.

A Antonio y María por su apoyo y su amistad sincera.

De forma muy especial a Lola, que me ha enseñado un mundo realmente apasionante y confió en mí. Gracias porque sin tu ayuda nada de esto sería posible.

A mi tía Paloma, por su cariño y sus buenos consejos.

A mis abuelos, por su lección de vida.

A mis padres porque todo se lo debo a ellos y porque son un referente en mi vida.

A todos vosotros y a los que de uno u otro modo habéis estado presente, GRACIAS.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.	1
2. INTRODUCCIÓN.	8
2.1. TRASPLANTE ALOGÉNICO.	9
2.2. EPIGENÉTICA.	11
2.2.1. <i>Historia de la epigenética.</i>	11
2.2.2. <i>La información epigenética.</i>	12
2.2.3. <i>Epigenética y respuesta inmune.</i>	15
2.3. 5-AZACITIDINA.	19
2.3.1. <i>Descripción de la 5-AZA.</i>	19
2.3.2. <i>Mecanismo de acción.</i>	20
2.3.3. <i>Farmacocinética.</i>	22
2.3.4. <i>Indicaciones y forma de administración.</i>	22
2.3.5. <i>Contraindicaciones.</i>	23
2.3.6. <i>5-AZA y respuesta inmune.</i>	24
2.4. 5-AZA Y PRAME.	25
2.4.1. <i>Descripción general de antígenos asociados a tumor.</i>	25
2.4.2. <i>Efecto de la 5-AZA sobre la expresión de PRAME y su aplicación en el trasplante.</i>	27
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	29
4. MATERIAL Y MÉTODOS.	32
4.1. MATERIAL.	33

4.1.1. Material biológico (células empleadas en el estudio).33
4.1.2. Material biológico (células empleadas en el estudio).33
4.1.3. Material no biológico (reactivos).....	34
4.2. MÉTODOS.39
4.2.1. Estudios in vitro.39
4.2.1.1. Estudios de activación linfocitaria y viabilidad tras 2 días de cultivo.40
4.2.1.1.1. Estudios de activación celular mediante citometría de flujo a dos días.41
4.2.1.1.2. Estudios de viabilidad celular42
4.2.1.2. Estudios de proliferación celular y viabilidad tras 4 días de cultivo.43
4.2.1.2.1. Estudios de proliferación y viabilidad celular mediante marcaje con PKH a cuatro días.43
4.2.1.2.2. Estudio del ciclo celular.45
4.2.1.2.3. Estudio de citocinas solubles.46
4.2.2. Estudios in vivo.47
4.2.2.1. Modelo Murino de EICH.47
4.2.2.2. Estudio de expresión proteica de FOXP3 en células T reguladoras murinas.50
4.2.3. Expresión de genes.51
4.2.3.1. Estudio del perfil de expresión génica mediante “microarrays”.51
4.2.3.2. Estudio de expresión de genes que regulan el ciclo celular y la respuesta inmune por RQ-PCR53

4.2.3.3.	<i>Estudio de la expresión de TBET, GATA-3, ROR-γ, FOXP3 por RQ-PCR.....</i>	54
4.2.3.4.	<i>Estudios de metilación de los promotor de TBET, GATA-3 y FOXP3.....</i>	54
4.2.4.	<i>Modulación de la expresión de PRAME con 5-azacitidina.....</i>	56
4.2.4.1.	<i>Estudio de la expresión de PRAME en blastos</i>	56
4.2.4.2.	<i>Estudio de expresión de PRAME en CD34⁺ de donantes sanos.</i>	58
4.2.4.3.	<i>Estudio de metilación de PRAME en blastos y en CD34⁺</i>	59
4.2.5.	<i>Análisis estadístico.</i>	59
5.	RESULTADOS.	60
5.1	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA 5-AZA SOBRE LOS LT Y SU POSIBLE USO EN EL TRASPLANTE ALOGÉNICO....	61
5.1.1.	<i>Efecto de la 5-AZA sobre la activación de los LT.</i>	61
5.1.2.	<i>Efecto de la 5-AZA sobre la producción de citocinas.</i>	64
5.1.3.	<i>Efecto de la 5-AZA sobre la viabilidad de los LT.</i>	65
5.1.4.	<i>Efecto de la 5-AZA sobre la proliferación y el ciclo celular de los LT.</i>	66
5.1.5.	<i>Efecto de la 5-AZA sobre el perfil de expresión génica.</i>	68

5.1.6. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión de genes que regula el ciclo celular.	71
5.1.7. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión de genes que regulan la respuesta inmune.	72
5.1.8. Efecto de la 5-AZA en un modelo murino de EICH severo.	73
5.1.9. Efecto de la 5-AZA sobre células T reguladoras en ratones BALB-C.	76
5.1.10. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión de los genes TBET, GATA-3, ROR- γ y FOXP3.	77
5.1.11. Efecto de la 5-AZA sobre la metilación del promotor de FOXP3.	78
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA 5-AZA SOBRE LA EXPRESIÓN DE AAT: PRAME.	81
5.2.1. Expresión de PRAME en blastos versus CD34 ⁺ de donantes sanos.	81
5.2.2. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión y metilación de PRAME en blastos y en CD34 ⁺ de donantes sanos.	82
6. DISCUSIÓN.	84
7. CONCLUSIONES.	91
8. BIBLIOGRAFÍA.	94
9. ANEXO.	101

9.1. IMMUNOMODULATORY EFFECT OF 5-AZACYTIDINE (5-AZAC): POTENCIAL ROLE IN THE TRASPLANTATION SETTING.....	102
9.2. EPIGENETIC REGULATION OF <i>PRAME</i> IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA IS DIFFERENT COMPARED TO CD34⁺ CELLS FROM HEALTHY DONORS. EFFECT OF 5-AZA TREATMENT.....	117

1. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

AAT: Antígeno asociado a tumor.

AcMo: Anticuerpos monoclonales.

APC: Alococianina.

APC: Célula presentadora de antígenos.

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

CEA: Antígeno carcinoembrionario.

CD: Célula dendrítica.

CD40L: Ligando CD40.

CMF: Canal medio de fluorescencia.

CMN: Células mononucleadas.

CpG: Secuencias de citosinas-guaninas no metiladas de origen microbiano.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DNMT: DNA metiltransferasa.

DNMTi: inhibidores de DNA-metiltransferasas.

EICL: Enfermedad injerto contra leucemia.

EICH: Enfermedad injerto contra huésped.

ESCC: Esophageal squamous cell carcinoma (carcinoma de células escamosas de esófago).

FDA: United States Food and Drug Administration.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FSC: Forward scatter (dispersion frontal de la luz).

HADCs: deacetilasas de histonas.

HBSS: Hanks solution 1x con 0.35g/l NaCO₃.

HAT: Histona acetiltransferasa.

HMT: Histona metiltransferasa.

IFN- α : Interferón- α .

IFN- γ : Interferón- γ .

IL2: Interleucina 2.

IL4: Interleucina 4.

IL6: Interleucina 6.

IL10: Interleucina 10.

IL-12: Interleucina 12.

IV: Intravenosa.

LMA: leucemia mieloide aguda.

LMC: leucemia mieloide crónica.

LMMC: leucemia mielomnócítica crónica.

LT: Linfocitos T.

MAGE: Antígeno del melanoma.

MBPs: Methyl CpG-binding protein.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MoAb: Anticuerpo monoclonal.

NF- κ B: Factor nuclear kappa-beta.

NFAT: Factor nuclear de células T activadas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Solución salina fosfatada.

PE: Ficoeritrina.

PerCp Cy5.5: Proteína peridinín cloroflica-cianina 5.5.

PHA: Fitohemaglutina.

PKC: Proteína quinasa C.

PLC: Fosfolipasa C.

PMA: Forbol miristato acetato.

PRAME: Antígeno expresado preferentemente de melanoma.

rpm: Revoluciones por minuto.

SAM: S-adenosilmetionina.

RPMI: Medio de cultivo empleado para el cultivo de células mononucleada. Roswell Park Memorial Institute.

Suero AB: Suero AB de humano.

SC: Subcutánea.

SMD: Síndrome mielodisplásico.

SPSS: Statistical analyses the SPSS software program (Programa de análisis estadístico).

SSC: Side scatter (dispersion lateral de la luz).

TCR: Receptor antigénico.

TF: Factor de transcripción.

TLR: Toll like receptor (Receptor tipo toll).

TNF- α : Factor de necrosis tumoral de tipo α .

Treg: Linfocitos T reguladores.

5-AZA: 5-azacitidina.

5-AZA-dC: 5-azacitidina-2'-deoxicitidina.

7-AAD: 7-amino-actinomicina-D.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. TRASPLANTE ALOGÉNICO.

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos representa la única posibilidad de curación para numerosos pacientes con hemopatías malignas, lo que justifica el número creciente de trasplantes realizados a nivel mundial desde su desarrollo inicial hace más de 30 años. Se trata, por tanto, de una estrategia terapéutica sobre la que existe una amplia experiencia. A pesar de ello, aún hoy en día los resultados del trasplante están lejos de ser los idóneos y esto se debe, en gran medida, a la elevada toxicidad relacionada con el procedimiento que puede provocar hasta un 20-50% de mortalidad^{1,2}. En concreto, la enfermedad injerto contra huésped (EICH), que se debe al efecto citotóxico de los linfocitos T del donante sobre 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 trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado³. Sin embargo, precisamente en este reconocimiento y efecto citotóxico de los linfocitos del donante frente a antígenos extraños reside también el efecto curativo del trasplante alogénico, de manera que los linfocitos desencadenan una respuesta inmune frente al tejido hematopoyético y las células tumorales del paciente, provocando el efecto injerto contra leucemia (EICL)^{4,5}.

A pesar de los esfuerzos de numerosos grupos de investigación a nivel mundial durante muchos años, en la actualidad aún no se ha podido desarrollar ningún procedimiento que permita separar el EICL (beneficioso) de la EICH (perjudicial) de manera que, en la práctica, los procedimientos más eficaces en la prevención de la EICH, como la depleción de linfocitos T del donante, provocan también una

inmunosupresión más profunda y, por tanto, un mayor riesgo de recaída (menor EICL) o de infecciones potencialmente fatales en el periodo postrasplante⁶.

Por tanto, es fundamental el desarrollo de nuevas estrategias que prevengan la EICH sin eliminar el EICL ni la respuesta inmune frente a patógenos o agentes infecciosos que, tras la EICH, constituyen la segunda causa de mortalidad tras el trasplante. En definitiva, el objetivo es dirigir la respuesta inmune hacia la diana tumoral evitando su activación frente a otros antígenos.

Aunque la EICH es un proceso complejo, el papel fundamental en su desarrollo se atribuye a las células dendríticas (CDs) del receptor^{7,8}, que actúan como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T del donante, específicamente a aquellos que reconocen antígenos del receptor (células T alorreactivas).

La unión del linfocito T al antígeno a través de su receptor TCR/CD3 conduce a la activación de diversas tirosin-quinasa, proteín quinasa C (PKC), fosfolipasa C (PLC) y a la activación de calcineurina⁹. Sin embargo, para que la interacción antígeno-linfocito T provoque una respuesta inmune adecuada, deben activarse otras vías de señalización a través de moléculas co-estimuladoras como CD28 ó CD40L. Estas vías finalmente convergen en factores de transcripción como NF-kB, NFAT o AP-1⁹ que inducen la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune o la proliferación celular¹⁰.

Muchas de las vías de señalización mencionadas, que conducen a la activación linfocitaria, están reguladas a nivel epigenético. A pesar de ello, la utilización de

fármacos que actúen a este nivel en el contexto del trasplante alogénico supone una estrategia que apenas ha sido abordada hasta el momento.

2.2. EPIGENÉTICA.

2.2.1. Historia de la epigenética.

Se atribuye a Conrad Waddington (1905-1975) la definición del término “epigenética” (del griego epi, en o sobre) en el año 1942 como “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo”.

Las primeras apariciones de la epigenética en la literatura datan de mediados del siglo XIX, aunque los orígenes del concepto se atribuyen a Aristóteles (384-322 AC). Aristóteles creía en la epigénesis: “el desarrollo de la forma orgánica del individuo a partir de materia amorfa”¹¹.

En la actualidad, la definición más frecuente del término epigenética es “el estudio de cambios en la función génica que se producen sin un cambio en la secuencia del ADN”, y establece un puente entre las influencias genéticas y ambientales¹¹⁻¹³.

La epigenética se refiere a cambios reversibles del ADN que provocan que unos genes se expresen o no dependiendo de condiciones exteriores (polifenismo). La epigenética permite reprogramar el genoma sin necesidad de modificar el material

genético y supone la base para el desarrollo de tecnologías como la clonación y la terapia celular basadas en la utilización de células madre, dado que “el silenciamiento genético” desempeña un papel fundamental en procesos como la plasticidad y la diferenciación celular. Es decir, a pesar de ser portadoras de la misma “base de datos genética” las células pueden diferenciarse hacia una estirpe u otra merced a la activación/inactivación de determinados genes. De esta manera, células genotípicamente idénticas pueden ser fenotípicamente diferentes. Así, la epigenética, por tanto, explica las discordancias entre gemelos idénticos, que comparten secuencias de ADN idénticas

12,13

2.2.2. La información epigenética.

La información epigenética modula la expresión de genes mediante la metilación/demetilación de islas CpG, regiones de ADN de al menos 200 pares de bases ricas en GC que conforman aproximadamente el 40% de las regiones promotoras de mamíferos, y mediante la modificación de histonas: acetilación/desacetilación y metilación/demetilación.

a) Metilación de islas CpG:

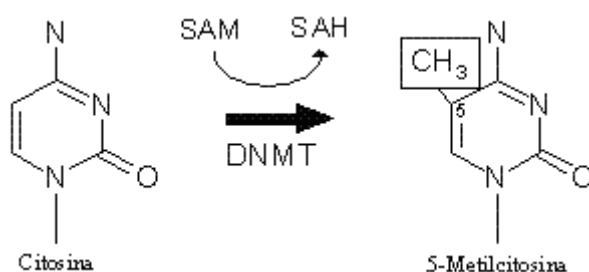


Figura 1: Metilación de las citosinas del ADN en la posición C-5 mediante la enzima DNA metiltransferasa.

Es una modificación del ADN, en la que un grupo metilo (-CH₃) es transferido desde la S-adenosilmetionina (SAM) a la posición C-5 de una citosina mediante una ADN-metiltransferasa (DNMT). La metilación del ADN ocurre casi exclusivamente en dinucleótidos CpG, teniendo un importante papel en la regulación de la expresión del gen. Aproximadamente el 70% de las secuencias 5'-CpG-3' del genoma de mamíferos están metiladas

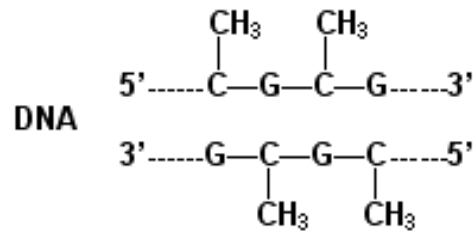


Figura 2: La mayoría de las citosinas de las secuencias 5'-CpG-3' del genoma están metiladas.

La metilación del ADN permite inhibir la expresión de genes. El grupo metilo de la 5-metilcitosina se proyecta hacia el surco mayor de la hélice de ADN donde puede interferir fácilmente con la unión de las proteínas que estimulan la transcripción¹⁴. La ausencia relativa de 5-metilcitosina en las proximidades del lugar de iniciación de la transcripción se conoce como hipometilación.

b) Modificación de histonas: las histonas son proteínas de baja masa molecular que forman la cromatina junto con el ADN sobre unas unidades conocidas como nucleosomas.

Algunos modelos experimentales sugieren que la metilación a nivel de la región promotora no promueve por sí sola el silenciamiento o inhibición de la transcripción génica, sino que inicia un proceso mediante el que las proteínas (histonas) son reclutadas a esa región, lo que conduce finalmente a la inhibición de la transcripción^{15,16}. No obstante, otros estudios sugieren que la metilación del ADN podría ser un fenómeno secundario, de manera que no estaría claramente establecido si la metilación del ADN es el fenómeno primario que inicia el silenciamiento génico ó un evento secundario que se produce una vez se ha iniciado el remodelado protéico¹⁶.

En cualquiera de los dos casos, la metilación del ADN por sí misma favorece la unión de MBPs¹⁶(*methyl CpG-binding protein*) que forman complejos que contienen histonas desacetilasas (HDACs)¹⁶. Las HDACs contribuyen a reprimir la transcripción. Una de las reacciones claves en la inhibición de la expresión génica es la desacetilación de histonas, en concreto de lisinas acetiladas¹⁴⁻¹⁷. La desacetilación permite mantener el nucleosoma compactado y transcripcionalmente silenciado porque los factores de transcripción (TF) no tienen acceso¹⁶.

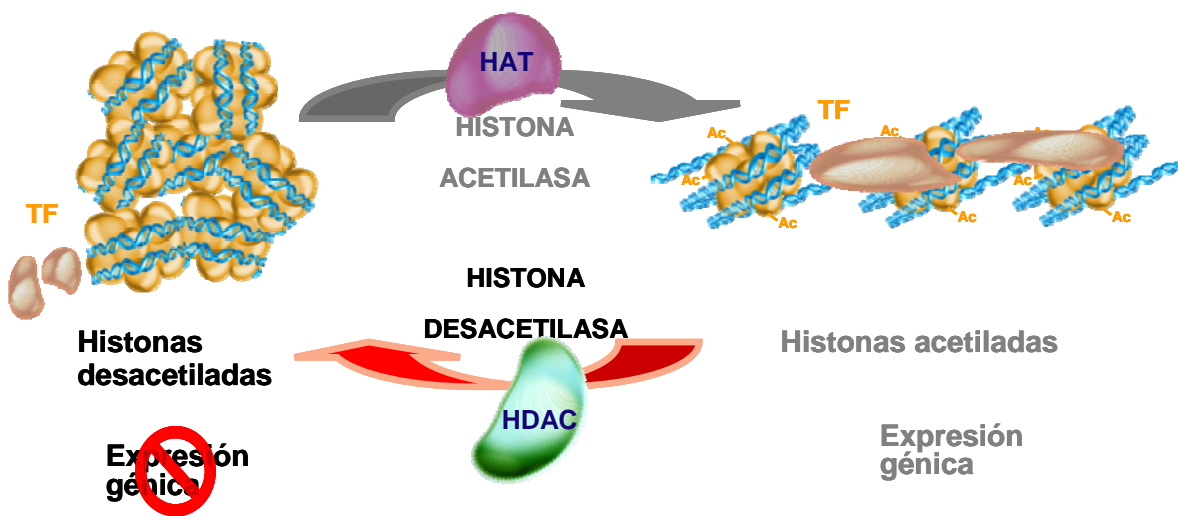


Figura 3: La regulación de la expresión génica a través de los mecanismos epigenéticos acetilación y desacetilación de histonas están controlados por las enzimas HAT y HDAC.

Por el contrario, la acetilación de las colas de histona a través de las histonas acetilasas (HAT), proporciona un mecanismo para la incorporación de otros componentes a la maquinaria de transcripción, favoreciendo la expresión génica.

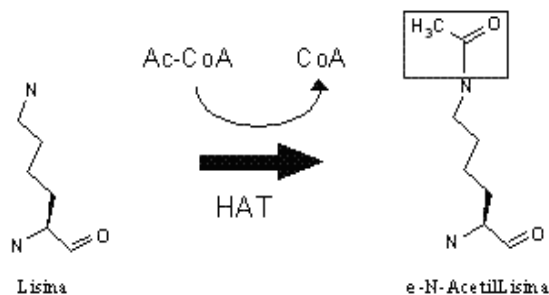


Figura 4: Acetilación de histonas en residuos de lisina por la enzima HAT.

Finalmente, la metilación de las histonas es otro mecanismo que regula la expresión génica. Las enzimas que catalizan esta reacción son las histonas metiltransferasas (HMTs) que metilan residuos de lisina ó arginina.

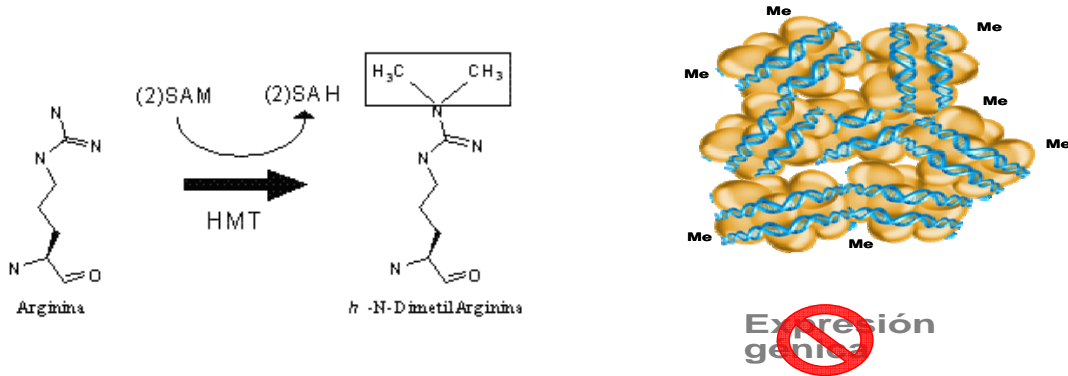


Figura 5: Metilación de histonas en residuos de arginina por la enzima HMT.

2.2.3. Epigenética y respuesta inmune.

Durante el desarrollo en el timo, los linfocitos T se diferencian hacia $LT\ \alpha\beta$ o $LT\ \gamma\delta$, según las cadenas que formen su receptor antigénico (TCR). Los $LT\ \alpha\beta$ se diferencian hacia $TCD4^+$ o $TCD8^+$; los mecanismos epigenéticos que regulan este proceso de diferenciación^{17,18} son diversos. Las células presentadoras de antígenos (APCs, *antigen presenting cell*) entran en contacto con los linfocitos T en los órganos linfoides y los linfocitos T interactúan con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) de las APCs a través de su TCR. Muy pocos linfocitos T tienen un TCR específico para un determinado péptido, por lo que continúan recirculando. Sin embargo, cuando un linfocito T reconoce un antígeno específico y recibe una segunda señal coestimuladora procedente de las APC, se activa y comienza a dividirse generando un gran número de linfocitos capaces de reconocer al antígeno. Una vez que ha proliferado y adquirido su función efectora, el

linfocito T abandona el órgano linfoide y se disemina por la corriente sanguínea en busca del antígeno. La fase efectora de la respuesta inmune adaptativa varía según el tipo de patógeno^{19,20} y del linfocito T que se active en su respuesta dependiendo de las citocinas producidas por las APCs durante la presentación del antígeno.

La estimulación linfocitaria vía TCR, en ausencia de co-estimulación, induce anergia. Curiosamente, se ha descrito que la expresión de numerosos genes involucrados en la respuesta inmune está regulada a nivel epigenético, de manera que la estimulación vía TCR no es suficiente para promover la acetilación de histonas o demetilación de citosinas de la región promotora de genes relacionados con la respuesta inmune. Así, la región promotora de interleucina 2 (IL-2) se encuentra inaccesible en células anérgicas al encontrarse metilada; por el contrario, la coestimulación vía CD28, que activa la vía de señalización de PI3K/pAkt, provoca la demetilación a nivel del promotor de IL-2, favoreciendo su expresión y por tanto generando una respuesta inmune²¹. En cambio, la metilación de las citosinas de las islas CpG reprime la transcripción de IL-2¹⁸. El gen de IFN también se activa tras la demetilación de su promotor²² y así, en linfocitos de memoria, se produce una demetilación rápida de su promotor en respuesta a estímulos, a diferencia de los linfocitos *naive* que tienen una respuesta mucho más lenta¹⁹. Esta diferencia a nivel epigenético justificaría, al menos en parte, la producción de una respuesta más vigorosa en la respuesta inmune secundaria frente a la respuesta inmune primaria, y muestra claramente la importancia de los cambios epigenéticos en la regulación de la activación linfocitaria²².

Los linfocitos CD4⁺ T (*helper*) presentan diferentes posibilidades de diferenciación, que dependen fundamentalmente de la expresión o no de determinados

genes. Éstos, a su vez, están regulados a nivel epigenético, de manera que finalmente el tipo de respuesta inmune dependerá de los patrones de metilación de los genes implicados en el control de la respuesta inmune. Así, la diferenciación hacia Th1 se produce merced a la expresión del factor de transcripción *T-BET*, tras estimulación del linfocito con IL-12 e IFN- γ y se caracteriza por la producción de citocinas como IL-2 ó INF- γ . Los linfocitos Th1 abandonan el órgano linfoide donde se han activado y van al lugar de infección para activar a los macrófagos, favoreciendo la destrucción de las células que hayan sido infectadas, dando lugar a una respuesta inflamatoria o celular de los linfocitos T. Este tipo de respuesta, Th1, es esencial para la eliminación de patógenos intracelulares que son capaces de vivir en los fagosomas de los macrófagos que no han sido activados.

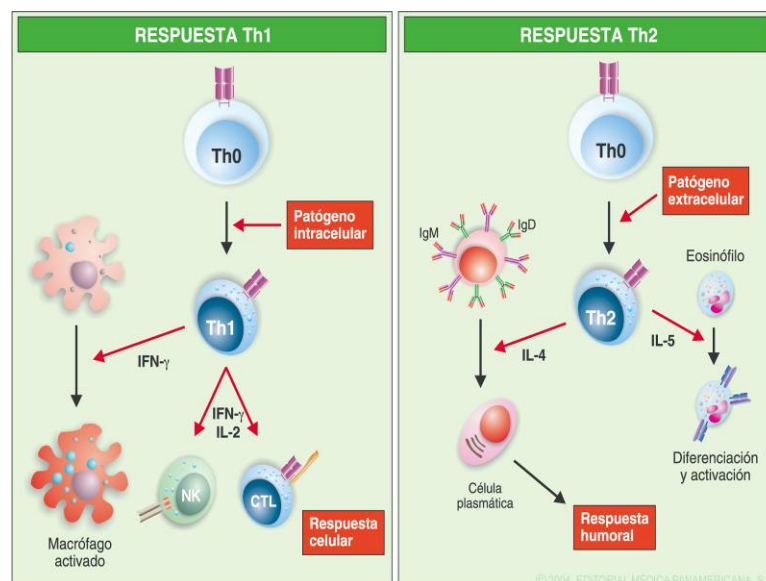


Figura 6: ¹⁹J.R. Regueiro González, C. López Larrea, S. González Rodríguez, E. Martínez Naves. *Inmunología biología y patología del sistema inmune. Panamericana; 2004.*

La diferenciación hacia Th2 se produce merced a la expresión del factor de transcripción *GATA-3* tras la estimulación del linfocito con IL-4 e IL-2 y se caracteriza por la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-25 y anfiredulina. Los

linfocitos Th2 dan lugar a la respuesta humoral y están destinados principalmente a la eliminación de patógenos extracelulares, produciendo una activación de clones específicos de linfocitos B previamente preactivados por el propio antígeno. El encuentro entre los linfocitos Th2 y los linfocitos B ocurre, también, en los órganos linfoides secundarios^{19,20}. Como queda mencionado anteriormente, esta polarización Th1/Th2 está regulado también a nivel epigenético.

La diferenciación hacia Th17 es inducida por la expresión de *ROR-γ* y la presencia de IL-6, IL-21, IL-23 y TGF-β. Estas células producen IL-17a, IL-17f, IL-21 e IL-22 para mediar la respuesta inmune contra bacterias extracelulares y hongos y participan en el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes.

Finalmente, la diferenciación hacia iTreg se produce merced de la expresión de *FOXP3* y es inducida por la presencia de TGF-β e IL-2. Estas células realizan su función a través de las siguientes citocinas: TGF-β, IL-10 e IL-35²³. Esta población linfocitaria, los linfocitos T reguladores (nTreg, *naturally occurring regulatory T cells*) actúan en la periferia regulando la respuesta inmune y evitando la activación de clones autorreactivos, de manera que regulan la activación del sistema inmune frente a antígenos propios. El interés sobre linfocitos T reguladores ha aumentado gracias a modelos experimentales en ratones que demuestran que el potencial inmunosupresor de estas células podría aprovecharse para aumentar la supervivencia a trasplantes al disminuir la EICH²⁴. Los nTreg se caracterizan por un fenotipo CD4⁺CD25⁺CD127⁻, por una escasa capacidad proliferativa y por la expresión del factor de transcripción *FOXP3*. Pues bien, la expresión de *FOXP3* en nTreg también está sometida a un control epigenético, de manera que las secuencias CpG del promotor de *FOXP3* se encuentran demetiladas en nTreg. La incubación de linfocitos no reguladores (CD4⁺CD25⁻) en

presencia de TGF- β permite obtener células T reguladoras inducidas (iTreg) *in vitro* y esta diferenciación hacia linfocito regulador se caracteriza por la demetilación a nivel de *FOXP3*²⁵

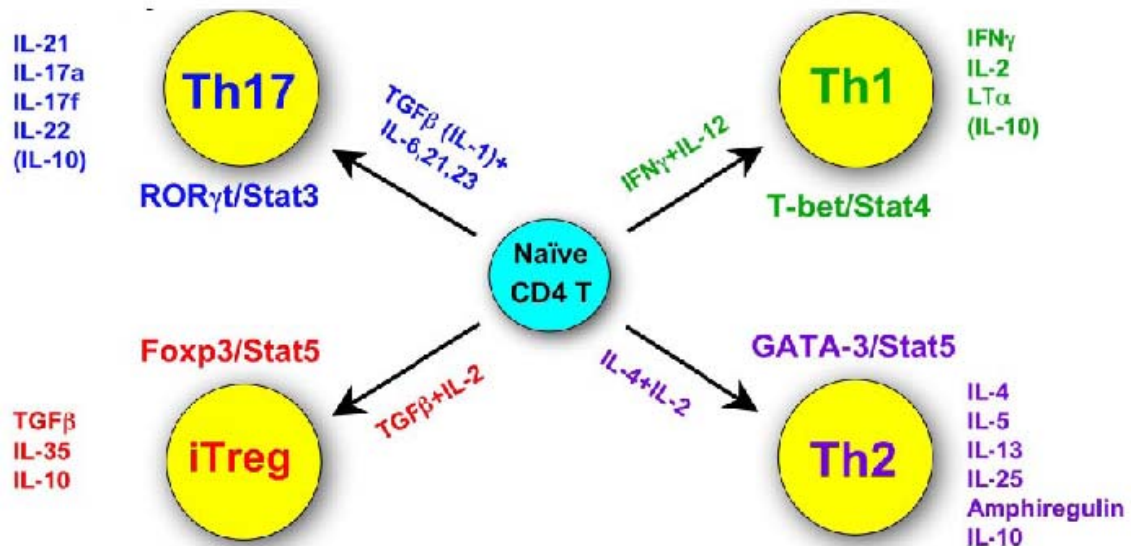


Figura 7: ²³Jinfang Zhu and William E. Paul. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008 112:1557-1569.

Como puede comprobarse, la expresión de diversos factores de transcripción, controlados a nivel epigenético, regula la diferenciación de los linfocitos T en una u otra dirección.

2.3. 5-AZACITIDINA.

2.3.1. Descripción de la 5-AZACITIDINA.

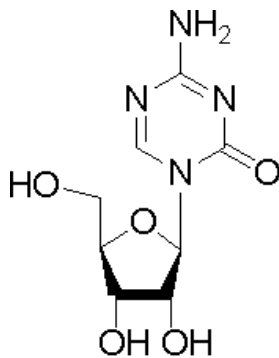


Figura 8: Estructura química de la 5-azacitidina

5-azacitidina (5-AZA) es un azanucleósido pirimidínico análogo de citidina. La 5-AZA es la 4-amino-1- β -D-ribofuranosil-s-triazin-2(1H)-ona. Su peso molecular es 244 g/mol. La 5-AZA es un sólido de coloración blanca o hueso, insoluble en etanol y metiletilcetona; ligeramente soluble en etanol/agua (50/50), propilenglicol y polietilenglicol; moderadamente soluble

en agua, octanol hidrosaturado, dextrosa al 5% en agua, N-metil-2-pirrolidona, solución salina y Tween 80 al 5% en agua; y soluble en dimetilsulfóxido (DMSO)¹⁷. La suspensión inyectable de 5-AZA se ha comercializado bajo el nombre de VidazaTM.

2.3.2. Mecanismo de acción.

La primera publicación en la que se define a la 5-azacitidina como un agente demetilante del ADN data del año 1980 (Jones y col)²⁶.

La hipometilación puede restaurar la función normal de genes cuya función es crucial para los procesos de diferenciación y proliferación celular. La concentración de azacitidina que se requiere para lograr una máxima inhibición de la metilación del ADN *in vitro* no causa una inhibición importante de la síntesis de ADN. Los efectos citotóxicos de la 5-AZA provocan la muerte de las células de división rápida, incluidas las células cancerosas que ya no responden a los mecanismos normales de control del crecimiento. Las células que están en situación no proliferativa, son relativamente insensibles a la 5-AZA^{17,27}.

Los azanucleósidos 5-azacitidina y 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA-dC) fueron sintetizados en 1960 y aprobados por la FDA (*United States Food and Drug Administration*) como los dos primeros inhibidores de DNA-metiltransferasas (DNMTi). Ambos fármacos fueron aprobados para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos (SMD) y se estudiaron en altas dosis para el tratamiento de leucemias agudas^{28,29}. *In vitro*, estos nucleósidos son incorporados al ADN, donde forman uniones irreversibles con DNMT, enzima necesaria para la metilación de las citosinas del ADN.

La eliminación funcional de DNMT por los azanucleósidos conduce a cambios en la metilación, afectando a la división celular.

Estos fármacos son los primeros que tienen como diana terapéutica las modificaciones epigenéticas. La aplicación de la 5-AZA en el tratamiento de los SMD debe atribuirse a Lewis Silverman, quien defendió este fármaco desde los primeros ensayos en Mt. Sinai Medical Center en Nueva York, y posteriormente en el Cancer and Leukemia Group B. El Dr. Silverman y sus colaboradores desarrollaron el primer estudio en SMD y demostraron su actividad clínica administrado tanto por vía intravenosa como subcutánea²⁸.

Silverman llevó a cabo un ensayo clínico en pacientes con SMD y leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)²⁸, demostrando una respuesta hematológica en el 47% de los pacientes, incluyendo un 10% de remisiones completas. Los datos del ensayo clínico sirvieron como base para que la FDA aprobara la 5-AZA.

La eficacia de los DNMTi en el tratamiento de SMD llevó a los investigadores a estudiar el papel de la metilación del ADN en hemopatías malignas. En este sentido, p15 es probablemente el gen que se metila más frecuentemente en SMD. La metilación del gen SOCS-1 ha sido constatada en el 31-47% de los pacientes, mientras que el gen RASSF1 se encontraba metilado en un 9% de los casos estudiados. En una serie de 13 pacientes de SMD, las células CD34⁺ presentaban metilaciones frecuentes de p15, p16, p73, RAR β , DAP Kinasa y WT-1²⁸. La metilación reversible de p15 ó CDH-1 durante el primer ciclo de terapia se correlacionó con la respuesta al tratamiento en el estudio de Fase I²⁸.

Además de los efectos inhibidores de DNMT, los azanucleósidos podrían también dañar el ADN. Estos efectos deben de ser analizados en futuros estudios²⁸.

2.3.3. Farmacocinética.

La biodisponibilidad absoluta de la 5-AZA administrada por vía subcutánea con respecto a la de 5-AZA por vía intravenosa es de aproximadamente el 89%. El volumen medio de distribución tras la administración intravenosa es de 76 ± 26 L/hora. El aclaramiento medio sistémico aparente es de 147 ± 47 L/hora y la semivida de eliminación media de 41 ± 8 minutos, después de la administración por vía subcutánea³⁰.

Los estudios publicados hasta el momento sugieren que la excreción urinaria es la vía principal de eliminación de la 5-azacitidina y sus metabolitos^{17,30} después de la administración por vías intravenosa y subcutánea.

2.3.4. Indicaciones.

La 5-AZA está indicada³⁰ para el tratamiento de pacientes adultos que no se consideran aptos para el trasplante de células madre y que padecen:

- Algunos de los siguientes subtipos de síndromes mielodisplásicos: anemia refractaria o anemia refractaria con sideroblastos en anillo (si se acompañan de neutropenia o trombocitopenia o requieren transfusiones), anemia refractaria con exceso de blastos y anemia refractaria con exceso de blastos en transformación.
- Leucemia mielomonocítica crónica con el 10 al 29% de blastos medulares sin trastorno mieloproliferativo.

- Leucemia mieloide aguda con 20 al 30% de blastos y displasia multilinea, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

El uso de la 5-AZA no está recomendado en niños menores de 18 años debido a la escasez de datos sobre la seguridad y la eficacia.

Uso en ancianos: No se observaron diferencias globales en cuanto a eficacia entre estos pacientes y los de edades más jóvenes. Además, la frecuencia de aparición de acontecimientos adversos observada en los pacientes de edad igual o superior a 65 años no presentó diferencias relevantes en comparación con la observada en los pacientes de menor edad. Debido a que la 5-AZA y sus metabolitos se excretan en gran medida por el riñón, el riesgo de que se produzcan reacciones de toxicidad en respuesta a este fármaco puede ser mayor en los pacientes con deterioro de la función renal. Dado que los pacientes ancianos tienen una mayor probabilidad de presentar una disminución de la función renal, la monitorización renal puede resultar útil en dichos pacientes¹⁷.

2.3.5. *Contraindicaciones.*

La 5-AZA está contraindicada en los pacientes con hipersensibilidad a la azacitidina o al manitol; también en los pacientes con tumores hepáticos malignos en estadio avanzado. La 5-AZA puede causar daños fetales si se administra a una mujer embarazada, pudiendo dar lugar a distintos efectos teratogénicos¹⁷. Se desconoce si la 5-azacitidina o alguno de sus metabolitos se excretan en la leche humana. Debido a las posibles reacciones adversas graves en el niño lactante, la lactancia está contraindicada durante el tratamiento con 5-AZA³⁰.

2.3.6. 5-AZA y respuesta inmune.

Si bien su efecto en progenitores hematopoyéticos en pacientes con SMD o leucemia mieloide aguda (LMA) ha sido bien descrito, su efecto sobre las diferentes poblaciones linfocitarias se desconoce. En células NK se ha descrito que puede favorecer la demetilación de *FOXP3*³¹. Así mismo, Rohner *et al*³² ha estudiado el efecto de la 5-AZA sobre el NKG2D, receptor de activación expresado en todas las células NK y en todas las subpoblaciones de linfocitos T. La unión de NKG2D con sus ligandos induce la activación de las células NK. Los datos de este estudio indican que el tratamiento con 5-AZA en combinación con factores de crecimiento e IFN- γ aumenta la expresión del ligando de NKG2D, ULBP (proteína de unión UL16) en blastos de LMA induciendo mayor sensibilidad al efecto citotóxico de las células NK³².

Algunos autores^{33,34} han descrito un posible efecto demetilante de la 5-AZA sobre *FOXP3*, pudiendo controlar así la expresión de este gen y la respuesta inmune. Por el contrario, otros estudios indican que la 5-AZA actúa sobre la metilación del promotor de INF- γ , controlando de este modo la diferenciación de los LT *naive* hacia Th1 o Th2³⁵.

EL efecto de la 5-AZA sobre la respuesta inmune es, *a priori*, altamente impredecible dado que dependerá de la población linfocitaria sobre la que ejerza su efecto. En general, podría incrementar la respuesta inmune *in vitro* al activar la expresión de genes relacionados con la síntesis de citoquinas, como IFN- γ o IL-2 en linfocitos Th1 o IL-4 en Th2. Pero si la actividad hipometilante se efectúa sobre *FOXP3*, el efecto podría ser el contrario, dado que, como se ha descrito previamente, la

demetilación de este gen se relaciona con la actividad inmunosupresora de los linfocitos T reguladores (Treg)³².

2.4. 5-AZA Y PRAME

2.4.1. Descripción general de antígenos asociados a tumor: PRAME

Los antígenos son macromoléculas que se unen de forma selectiva a un anticuerpo induciendo una respuesta inmunitaria. Cuando éstos antígenos no son expresados o se expresan con baja intensidad en células normales en comparación con células tumorales se llaman *antígenos asociados a tumor* (AAT). En la mayoría de los casos, estos antígenos son componentes normales de la célula pero su expresión es aberrante o está mal regulada en los tumores. Las células cancerosas experimentan cambios significativos que, a menudo, dan lugar a la expresión de AAT, Estos AAT son presentados por moléculas MHC-I a los linfocitos T citotóxicos que desempeñan un papel de vigilancia, eliminando las células que sobreexpresan AAT antes de que proliferen o desarrollan metástasis¹⁴.

La vacunación de individuos portadores de tumores con AAT puede provocar una potenciación de la respuesta inmunitaria frente al tumor. Por ello, la previa identificación de péptidos y la clonación de genes que codifican para estos AAT, reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos, han proporcionado candidatos para el desarrollo de vacunas tumorales³⁶.

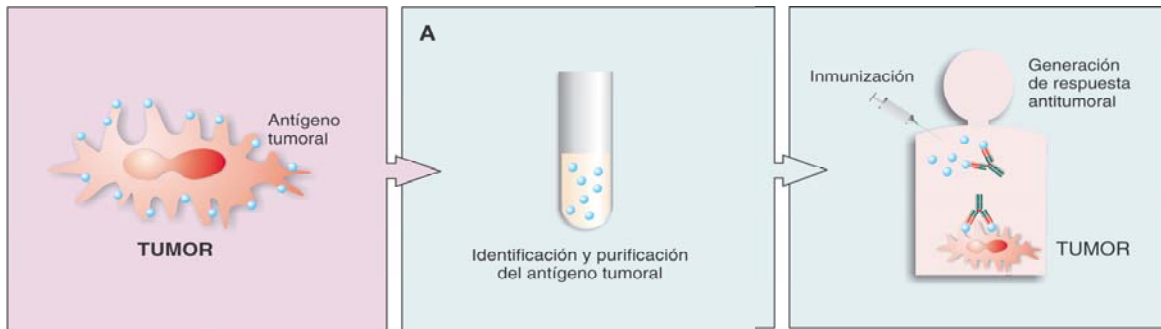


Figura 9: ¹⁹J.R. Regueiro González, C. López Larrea, S. González Rodríguez, E. Martínez Naves.

Inmunología biología y patología del sistema inmune. Panamericana; 2004.

En el caso de antígenos específicos de tumor, como los producidos por mutaciones puntuales aleatorias, estos métodos de vacunación no son prácticos, ya que requieren la identificación de los antígenos de cada tumor individual. Sin embargo, los antígenos tumorales compartidos por muchos tumores, como *MAGE* o *PRAME* en los melanomas o las proteínas mutadas Ras y p53 en muchos tumores, son inmunógenos potencialmente útiles para todos los pacientes con ciertos tipos de cáncer. Una limitación del uso de vacunas en el tratamiento de tumores ya establecidos es que resulta difícil inducir una respuesta inmunitaria lo suficientemente intensa como para erradicar todas las células tumorales en crecimiento³⁶.

El gen de *PRAME* del inglés (*preferentially expressed antigen of melanoma*) fue descrito por primera vez por Ikeda *et al*³⁷ en células tumorales de melanoma, donde codifica un antígeno que es reconocido por linfocitos T citotóxicos. Posteriormente van Baren *et al*³⁸ confirmó que *PRAME* codifica un antígeno asociado a melanoma y añadió que también se sobreexpresa en otros tumores, como sarcomas, tumores de cabeza y cuello, cáncer renal y en leucemias agudas, pero no en tejidos sanos. Esta baja expresión de *PRAME* en tejidos sanos permitiría utilizar éste antígeno como diana terapéutica en inmunoterapia frente a diversos tumores^{39,40} y también podría servir como marcador de

enfermedad mínima residual. En leucemias agudas es un marcador de buen pronóstico especialmente en aquellos pacientes que tienen traslocaciones citogenéticas favorables $t(8;21)$ ó $t(12;21)$ ^{41 42}. Sin embargo, en tumores sólidos la sobreexpresión de *PRAME* está asociada con estadios más avanzados de la enfermedad y mayor probabilidad de metástasis⁴².

Actualmente se sabe que el sistema inmune es capaz de reconocer las células tumorales *PRAME*⁺ a través de los linfocitos T CD8⁺ ^{39,40}. Por eso, esta clase de AAT es una diana terapéutica para el tratamiento contra tumores¹⁹.

2.4.2. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión de *PRAME* y su aplicación en el trasplante.

Como se ha mencionado anteriormente, la 5-AZA genera regiones hipometiladas en el ADN, produciendo cambios epigenéticos que no afectan a la secuencia del ADN pero que pueden activar la transcripción y, por tanto, la expresión de genes.

Román-Gómez *et al*⁴³ describen que son mecanismos epigenéticos los que regulan la expresión de AAT en células tumorales, teniendo un papel fundamental la metilación del ADN. La hipometilación de las islas CpG en los promotores de *MAGE*, *PRAME* y otros AAT se corresponde con una mayor expresión de estos antígenos en líneas celulares neoplásicas. También han comprobado que el tratamiento con 5-AZA incrementa la expresión de éstos AAT en líneas celulares. Epping *et al*⁴⁴ comprueba como la expresión de AAT se puede inducir con agentes demetilantes, siendo mecanismos epigenéticos los que controlan la expresión de *PRAME* en la mayoría de los tejidos adultos. También, Sigalotti *et al*⁴⁵ y Coral *et al*⁴⁶ han estudiado la sobreexpresión de AAT en tumores sólidos tras tratamiento con 5-AZA.

El trasplante de células hematopoyéticas se ha convertido en un recurso terapéutico imprescindible en la práctica moderna de la medicina. Este tipo de trasplantes se realizan con tres objetivos fundamentalmente: reemplazar el tejido hematopoyético defectuoso, insuficiente o neoplásico, para poder administrar al paciente quimioterapia y/o radioterapia a dosis altas e inducir el EICL en los paciente con tumores malignos hematopoyéticos. En la actualidad, parece que éste último efecto es el de mayor utilidad en el control a largo plazo de los tumores hematológicos.

En los estudios antes mencionados^{43,45,46}, el tratamiento con 5-AZA induce la expresión de AAT en células tumorales. Si el efecto de la 5-AZA se ejerciera sobre los blastos de pacientes de LMA sin afectar a las células hematopoyéticas del donante supondría una respuesta inmune específica de los linfocitos T CD8⁺^{39,40} del donador, frente a las células tumorales que sobreexpresan *PRAME*. De esta forma los linfocitos del donador terminarían por destruir las células leucémicas remanentes del enfermo consiguiéndose así, un mayor EICL.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha mencionado, la regulación epigenética de genes relacionados con la respuesta inmune es fundamental para controlar no sólo la activación o proliferación linfocitaria sino el tipo de respuesta Th1, Th2 o reguladora. La 5-azacitidina es un agente hipometilante del ADN y debido a su mecanismo de acción podría modificar la respuesta inmune. Sin embargo, su efecto sobre las diferentes poblaciones linfocitarias se desconoce. Por otra parte, se ha descrito que podría inducir la sobreexpresión de antígenos asociados a tumor en algunas hemopatías malignas o en melanoma, lo que podría ser de gran interés para generar una respuesta inmune específica frente a AAT en pacientes de LMA.

Nos planteamos como hipótesis de trabajo que la 5-AZA puede tener un efecto biológico relevante sobre la funcionalidad linfocitaria, que podría ser de interés en el contexto del trasplante hematopoyético: disminuyendo la EICH y generando una respuesta inmune específica frente a antígenos asociados a tumor, manteniendo así el EICL.

Nos planteamos en este trabajo los siguientes objetivos:

1. Estudiar como actúa la 5-AZA sobre la activación, proliferación y viabilidad de los linfocitos T.
2. Evaluar su utilidad en el contexto del trasplante hematopoyético para disminuir la EICH.

3. Inducir con 5- AZA la sobreexpresión de *PRAME* en blastos tumorales de pacientes de leucemia mieloide aguda y evaluar la utilidad de *PRAME* como diana terapéutica.

4. Evaluar el efecto de la 5-AZA sobre células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ de donantes sanos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL.

4.1.1. *Material biológico (células empleadas en el estudio).*

Todos los estudios *in vitro* de linfocitos T se realizaron a partir de concentrados leuco-plaquetarios (*Buffy-Coat*) de donantes sanos. Las células CD34⁺ procedieron de aféresis que se obtuvieron de aféresis de donantes de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica. Los blastos se obtuvieron de médula ósea y sangre periférica de pacientes con leucemia mieloblástica aguda de nuevo diagnóstico.

Para conseguir las diferentes muestras se obtuvo el correspondiente consentimiento informado y el procedimiento se realizó 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 bajo estrictas condiciones de esterilidad.

4.1.2. *Material biológico (ratones empleados en el estudio).*

Todos los estudios murinos se realizaron con ratones receptores hembra BALBc(H2d) y ratones donadores macho C57BL/6(H2b). Los ratones se obtuvieron de *Charles River Laboratory* (France). Éste trabajo se realizó en el Animalario de la Universidad de Salamanca de acuerdo con las normas establecidas por el Comité Ético del Animalario.

4.1.3. Material no biológico (reactivos).

Se emplearon los siguientes reactivos: suero fisiológico 0,9% de Baxter S.L. (Ribarroja del Turia, Valencia), medio de cultivo RPMI, PBS y antibióticos (penicilina y estreptomicina) de GIBCO BRL-Invitrogen (Grand Island, NY, EEUU). Medio oleoso para la separación de células mononucleadas (Ficoll-Paque) de GE-Healthcare Biosciences AB (Uppsala, EEUU), heparina libre de aditivos 5000U/ml de Biochrom AG (Berlin, Alemania). Fitohemaglutina (PHA), forbol miristato acetato (PMA), ionomicina y suero humano AB de Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EEUU). Anticuerpos monoclonales anti-human CD3 y anti-human CD28 de Becton Dickinson Biosciences-BDB, (San Jose, CA, EEUU). El agua destilada Vitulia estéril de Laboratorios ERN, SA (España). El *Kit de permeabilización IntraStain* para el marcaje intracelular, de DakoCytomation (Denmark). El marcaje de las células con PKH se realizó mediante el kit *PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit*, “for general cell membrane labeling”, solución HANKS, brefeldina y 5-azacitidina de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). El *kit de Anexina-V, 7-amino-actinomicina-D (7-AAD)* de BD Pharmingen™ BD, (San Diego, EEUU). El *kit de análisis de DNA nuclear de tejidos sólidos o suspensiones celulares* de Becton Dickinson Bioscience (San Jose, CA, EEUU), para los estudios de expresión protéica del gen *FOXP3* en linfocitos T humanos y murinos se utilizó el *kit de FOXP3 Staining Buffer Set* y el *kit Mouse Regulatory T Cell Staining* de eBioscience (San Diego, CA, EEUU) respectivamente y para el estudio de citocinas solubles usamos dos kits: *Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* para las citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ y el *kit Human IL-12 p70 Flex Set y Human soluble protein Master Buffer Kit* para analizar la IL-12 Becton Dickinson Biosciences-BDB (San Jose, CA, EEUU). Para los estudios de citometría utilizamos un

citómetro de flujo modelo FACSCalibur (Becton Dickinson Bioscience San Jose, CA, EEUU) y para separar los blastos tumorales un citómetro de flujo modelo FACS Aria (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA, EEUU). Los programas informáticos que se utilizaron para el análisis de los estudios de citometría fueron: 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).

Las células CD34⁺ procedentes de aféresis de donantes sanos se marcaron con el *kit CD34 MicroBead human* (Miltenyi Biotec) y para separar esta población utilizamos el AutoMacs^{PRO} (Miltenyi Biotec). La aféresis se realizó con el sistema Cobe Spectra™ (Lakewood Colorado, versión 7.0. EEUU).

Para la extracción del ARN y ADN se utilizaron los kits: *AllPrep DNA/RNA Micro Kit* y *el AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (Quiagen, Valencia, CA). 1µg de ARN se transcribió a cDNA utilizando el *kit de High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster, City, CA).

Los estudios para cuantificar la expresión de *PRAME*, *GATA-3*, *TBET*, *ROR-γ*, *FOXP3*, *IFNγ*, *IL-2* e *IL-4* se realizaron mediante RQ-PCR cuantitativa. Para la realización de esta técnica se utilizaron: enzima TaqMan® FastMaster Mix, ensayo de expresión comercial TaqMan® de Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). Utilizamos el termociclador Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, City, CA).

Para los estudios de expresión génica mediante arrays de expresión utilizamos GeneChip Human Gene 1.0 ST de Genechip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay Affymetrix (Santa Clara, CA, EEUU).

Para los estudios de metilación se purificó el ADN con el kit comercial *DNA clean up system* y *pGEM-T Easy vector* de Promega. El diseño de primers se realizó mediante el programa Methyl Primer Express v1.0 de Applied Biosystems (Foster City, CA, EEUU); las bandas de ADN se extrajeron del gel de agarosa con el kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* de Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, USA). El ADN se extrajo de las bacterias usando el kit *Plasmid DNA Purification. NucleoSpin Multi-96 Plus Plasmid* de Macherey-Nagel GmbH&Co (Germany), se purificó con el kit *Big Dye Xterminator Purification* Applied Biosystems (Foster City CA). El etanol absoluto fue de Merck KgaA, (Darmstadt, Germany). El NaOH de Panreac Química (Barcelona, España). La hidroquinona, bisulfito sódico, ampicilina y acetato amónico de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El glucógeno de Roche Applied Science (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias de metilación se analizaron con el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer de Applied Biosystems y posteriormente fueron analizadas con el programa BioEdit 7.0.9 (for windows 95/98).

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 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:

<i>Anticuerpo</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Isotipo</i>	<i>Procedencia</i>
			Becton Dickinson
CD2	FITC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.
		Mouse-Anti-Human	Beckman Coulter Company, Marselle. France.
CD3	FITC		Becton Dickinson
CD3	APC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA. Becton Dickinson
CD4	PerCP/Cy5.5	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA. Becton Dickinson
CD5	FITC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA. Becton Dickinson
CD7	FITC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA. Becton Dickinson
CD25	FITC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA. Becton Dickinson
CD25	PE	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.

			Becton Dickinson
CD33	APC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
CD34	APC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
CD40L	APC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
CD45	FITC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
CD127	PE	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
FOXP3	APC	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
IFN- γ	PE	Mouse-Anti-Human	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
CD4	FITC	Rat-Anti-Mouse	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
CD25	PE	Rat-Anti-Mouse	Bioscience San Jose, CA, USA.

			Becton Dickinson
CD45	PerCP/Cy5.5	Rat-Anti-Mouse	Bioscience San Jose, CA, USA.
			Becton Dickinson
FOXP3	APC	Rat-Anti-Mouse	Bioscience San Jose, CA, USA.

*Tabla I: 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**: Aloficocianina.*

4.2. MÉTODOS.

4.2.1. Estudios *in vitro*.

Las células mononucleadas se obtuvieron a partir de unidades de sangre total extraídas en sistema de bolsa LQT 6280 (Macopharma), de las cuales se obtuvo el *Buffy Coat*. La muestra se diluyó 1:8 con suero fisiológico y se separó la fracción mononucleada mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll. Las células se centrifugaron a 1600 rpm durante 30 min. Transcurrido este tiempo se obtuvo una interfase de células mononucleadas que se separó mediante el uso de pipetas pasteur estériles y que posteriormente se lavó 2 veces con la solución HANKS. El recuento celular se realizó mediante cámara de Neubauer. Una vez separada la capa mononucleada y llevado a cabo el recuento celular se sembraron $1 \times 10^5 / 200 \mu\text{L}$ células en cada pocillo de las placas de 96 pocillos ó $5 \times 10^5 / 500 \mu\text{L}$ en cada pocillo de las placas de 48 pocillos y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con un 10% de suero AB, penicilina 100U/mL y estreptomycinina 100 μg /mL.

Los estudios descritos a continuación se realizaron los días 2 ó 4 de cultivo en presencia o ausencia de 5-azacitina (5-AZA) a distintas concentraciones. Debido a la corta vida media del fármaco las diferentes dosis de 5-AZA se añadieron diariamente tanto para los cultivos a 2 como a 4 días.

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.

4.2.1.1. *Estudios de activación linfocitaria y viabilidad tras 2 días de cultivo.*

Se cultivaron 1×10^5 /200µL linfocitos T en placas de 96 pocillos y se emplearon 3 condiciones de cultivo:

- a) Células control.
- b) Células estimuladas con PMA (2,5ng/mL) e ionomicina (1µg/mL).
- c) Células estimuladas con anti-CD3 humano (5µg/mL) adherido a la placa y anti-CD28 humano soluble (2,5µg/mL). Se añaden 100µL de anti-CD3 a 5µg/mL en PBS en cada pocillo durante dos horas a 37°C, para pegar el anti-CD3 a la placa. A continuación, se retira y se lava 2 veces con 100µL de PBS y se bloquea con RPMI más 10% de suero AB durante una hora a 37°C. Finalmente y tras añadir las células mononucleadas se añade anti-CD28 a 2,5µg/mL.

Para cada cultivo, se pesaron 0,0050gr de 5-AZA, se resuspendieron en 1ml de DMSO (20mM) y diariamente se diluyó (5-AZA 20mM) en RPMI para poner la concentración correspondiente a cada cultivo: 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM ó 10000nM.

Todos los pocillos de las placas de 96 pocillos, tras dos días de cultivo, se estimularon con brefeldina durante 6 horas antes de su adquisición en el citómetro de flujo.

4.2.1.1.1. *Estudios de activación celular mediante citometría de flujo a 2 días.*

Marcaje intracelular: (CD25/IFN- γ /CD3/CD40L).

Una vez transcurridos 2 días de cultivo se añadió brefeldina (2 μ L/mL) a los pocillos, 6 horas antes del estudio por citometría. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió a cada pocillo 50 μ l de PBS. Las células se resuspendieron y se marcaron en tubos de citometria, el marcaje de antígenos de membrana se llevó a cabo con los anticuerpos monoclonales CD3 PerCP-Cy5.5 y CD25 FITC que se incubaron durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se añadieron a cada tubo 100 μ l de solución A (es una solución que contiene paraformaldehído) del *Kit de permeabilización IntraStain* y tras resuspender las células se incubaron durante otros 15 minutos. De este modo se fijaron las células y se estabilizaron las uniones entre el anticuerpo y el antígeno celular.

Seguidamente, las células se lavaron con PBS a 1200 rpm durante 10 minutos y, tras retirar el sobrenadante con pipetas Pasteur se realizó el marcaje de proteínas intracitoplásmicas. Para ello, se añadieron 100 μ l de la solución B del *Kit de permeabilización IntraStain* y los anticuerpos: IFN- γ PE y CD40L APC. La solución B lisa la serie roja que pudiera haber quedado y permeabiliza la célula debido a que contiene un detergente que genera poros en las membranas celulares, haciendo posible

el marcaje intracitoplasmático. Las células se incubaron durante 15 minutos y tras un lavado con PBS se resuspendió el botón celular en 0,5mL de PBS para posteriormente proceder a la adquisición de los tubos en el citómetro de flujo. Se adquirieron un total de 30000 eventos, en un citómetro de flujo modelo FACSCalibur, utilizando el programa informático CellQuest® y para el análisis empleamos el programa Infinicyt 1.1.

4.2.1.1.2. *Estudios de viabilidad celular (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) para citometría de flujo de BD. 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 pasarlas a tubos de citometría. Las células mononucleadas se incubaron con CD25-FITC y CD3-APC durante 15 minutos. Después de lavar con PBS a 1200 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100µL de Binding Buffer 1x, 5µL de anexina-V-PE y 5µL de 7-AAD. Después de 15 minutos de incubación se añadieron 400µL de Binding Buffer 1x e inmediatamente se adquirieron las células en el citómetro de flujo FACSCalibur. Se adquirieron un total de 30000 eventos, utilizando el programa informático CellQuest® y los eventos se analizaron mediante el programa: Infinicyt 1.1.

Para este estudio hemos considerado:

Células viables: Anexina⁻7AAD⁻

Células en apoptosis: Anexina⁺7AAD⁻

Células muertas: Anexina⁻7AAD⁺ o Anexina⁺7AAD⁺

4.2.1.2. *Estudios de proliferación celular y viabilidad tras 4 días de cultivo.*

Se cultivaron durante 4 días 1×10^5 células en 200 μ L de medio de cultivo en placas de 96 pocillos o 5×10^5 /500 μ L por pocillo en placas de 48 pocillos y emplearon las siguientes condiciones de cultivo:

- a) Células control.
- b) Células estimuladas con el mitógeno fitohemaglutina (PHA 5 μ g/mL).
- c) Células estimuladas con anti-CD3 (5 μ g/mL) y anti-CD28 (2,5 μ g/mL), según se ha descrito anteriormente.

Para cada cultivo, se pesaron 0,0050gr de 5-AZA, se resuspendieron en 1ml de DMSO (20mM) y diariamente se diluyó (5-AZA 20mM) en RPMI para poner la concentración correspondiente a cada cultivo: 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM ó 10000nM.

4.2.1.2.1. *Estudios de proliferación y viabilidad celular mediante marcaje con PKH a 4 días. (PKH/CD25/7-AAD/CD3).*

Para los estudios de proliferación y viabilidad 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. Cuando la 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.

Para realizar el marcaje de las células mononucleadas con PKH-67, siguiendo el protocolo del kit, se resuspendieron 5×10^6 células en 250 μ L de solución C y se añadieron otros 250 μ L de solución C que contenían 1 μ L de PKH-67. Las células se incubaron a 4°C durante 3.30 minutos en oscuridad y transcurrido ese tiempo se añadieron 500 μ L de suero AB pasado 1 minuto. Las células se lavaron 2 veces con PBS, se hizo un recuento y se sembraron en las placas de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente.

A los 4 días la placa se centrifugó a 1200rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de PBS/pocillo para resuspender las células y pasarlas a tubos de citometría. Las células se incubaron con CD25-PE y CD3-APC durante 15 minutos. Después de lavar con PBS a 1200 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en PBS y se llevó a cabo el marcaje con 7-AAD. Finalmente, se adquirieron un total de 30.000 eventos, en un citómetro 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 PKH positiva para posteriormente con el programa ModFit LT for Mac analizar la proliferación celular. La viabilidad celular se analizó con el programa Infinicyt 1.1. Mediante estos marcajes pudimos comprobar el grado de proliferación celular mediante citometría de flujo, medida como pérdida de fluorescencia de PKH y muerte celular (eventos 7-AAD⁺).

4.2.1.2.2. *Estudio de ciclo celular.*

Transcurridos los 4 días de cultivo se analizó el ciclo celular de las células mononucleadas en reposo o estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 en placas de 48 pocillos (5×10^5 células/500 μ L) en presencia ó ausencia de 5-AZA. Para estos estudios se utilizó el kit para análisis de DNA nuclear de tejidos sólidos ó suspensiones celulares.

En primer lugar se procedió al marcaje de antígenos de membrana utilizando los anticuerpos CD2, CD3, CD5 y CD7 conjugados con FITC. Las células se incubaron con los anticuerpos durante 15 minutos en oscuridad, se lavaron con PBS para retirar el exceso de anticuerpo libre y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 200 μ L de solución B (lleva un exceso de proteínas y ribonucleasa que elimina el ARN nuclear, al cual también se uniría el yoduro de propidio) y se incubaron las células durante 10 minutos en oscuridad. Finalmente, se añadieron 200 μ L de la solución C (lleva yoduro de propidio que se une al ADN de forma estequiométrica marcándolo para ser cuantificado en el citómetro de flujo) y se incubaron las células durante 10 minutos en oscuridad.

Se adquirieron un total de 30.000 eventos, en un citómetro FACSCalibur, utilizando el programa informático CellQuest®. Dichos eventos se analizaron mediante el programa: PAINT-A-GATE-PRO™ con el que se seleccionó la población de interés para posteriormente con el ModFit LT for Mac analizar el ciclo celular.

4.2.1.2.3. *Estudio de citocinas solubles.*

Para realizar el análisis de citocinas solubles partimos de 100µl de sobrenadante obtenido previamente de los cultivos de linfocitos T estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 durante 4 días en ausencia o en presencia de 5-AZA. Para realizar este estudio se utilizaron dos kits comerciales: BD™ Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine Kit II, que nos permitió analizar la presencia o ausencia de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ en el sobrenadante, y BD™ CBA Human IL-12 p70 Flex Set junto con BD™ CBA Human soluble protein master Buffer Kit, para analizar la presencia o ausencia en el sobrenadante de IL-12.

El protocolo de preparación se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En primer lugar, reconstituimos el estándar liofilizado incluido en cada uno de los kits, añadiendo un volumen exacto de Assay Diluent (1mL para el Kit Th1/Th2 y 2mL para IL-12). Posteriormente, preparamos diluciones seriadas de concentraciones conocidas, a partir de las diluciones iniciales de ambos estándares.

A continuación preparamos la mezcla de las esferas de captura para cada una de las citocinas a determinar, en el caso del kit Th1/Th2 (cada uno de los tipos de esferas emite una fluorescencia detectada en FL3 de diferente intensidad, lo que nos permitirá realizar un análisis simultáneo de seis citocinas solubles).

Una vez preparados todos los reactivos necesarios, mezclamos 50µL de las esferas de captura, 50µL de cada una de las diluciones estándar o muestra problema y 50µL del anticuerpo de detección (conjugado en PE). Incubamos durante 3 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, añadimos 1mL de Wash Buffer y

centrifugamos a 200G durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante, resuspendimos en 300µL de Wash Buffer y adquirimos en un citómetro FACSCalibur, utilizando el programa CellQuest.

El análisis de los datos se realizó utilizando el programa BD CBA Software.

4.2.2. *Estudios in vivo.*

4.2.2.1. *Modelo Murino de EICH.*

Se emplearon ratones donantes macho C57BL6 y ratones receptores hembra BALB/C. Estas dos cepas comparten el antígeno de clase I (H2) y difieren en antígenos miHAs (H2^d versus H2^b) con lo cual la EICH que se desarrolla es comparable a la que sucede en humanos y además esto permite la identificación y purificación de las células del donante en los ratones trasplantados.

Los ratones receptores y donantes se obtuvieron de *Charles River Laboratory* (France). Se obtuvieron las células de la MO de los fémures y las tibias de los ratones donantes y además, se obtuvieron esplenocitos (linfocitos T) del bazo tras disgregación mecánica de los mismos. Los animales receptores se irradiaron letalmente con 800cGy y en las 2-4 horas posteriores a la irradiación, recibieron por vía intravenosa una infusión de 5 millones de células de MO y 10 millones de células de bazo procedentes de los ratones donadores.

La 5-AZA se resuspendió en 1mL DMSO (20mM), y se administró vía endovenosa a través de las venas de la cola del ratón, a una dosis de 1mg/Kg de peso en un volumen de 300µL de RPMI.

Se diferenciaron 5 grupos experimentales. Cada uno de ellos estaba compuesto por 4 ratones y el experimento se repitió al menos 2 veces por grupo.

1. Control de irradiación (CI).
2. Control de MO (infusión de 5×10^6 células de MO).
3. Tratamiento con 5-AZA del control de MO (como el grupo 2 + 5-AZA).
4. Control de EICH (infusión de 5×10^6 células de MO + 5×10^6 células de bazo).
5. Tratamiento con 5-AZA del EICH (como el grupo 5 + 5-AZA).

TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA y ESPLENOCITOS

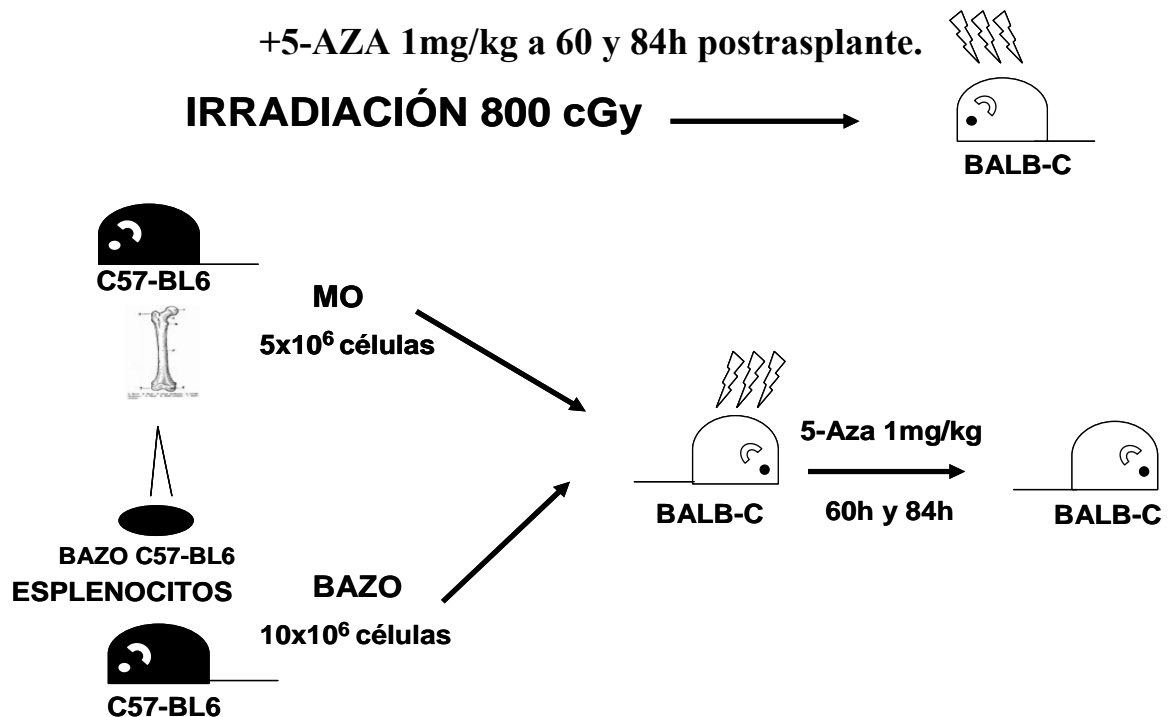


Fig10: modelo de trasplante de médula ósea y esplenocitos del bazo, en ratones CD57-BL6
+5-AZA 1mg/kg a las 60 y 84h postrasplante.

GRUPO	Irradiación 800cGy	MO	BAZO	5-AZA 1mg/Kg a 60h y 84h post infusión de MO	5-AZA 1mg/Kg los días 19,21 y 23 post-trasplante
1 Control irradiación	Si	No	No	No	No
2 Control MO	Si	Si	No	No	No
3 MO + 5-AZA	Si	Si	No	Si	Si
4 Control EICH	Si	Si	Si	No	No
5 EICH + 5-AZA	Si	Si	Si	Si	Si

Tabla II: modelo in vivo del trasplante alogénico y tratamiento con 5-AZA.

Después del trasplante, los ratones se pesaron 2 veces a la semana, durante las 8 semanas posteriores a la administración de la 5-AZA y se comprobó la aparición de signos de EICH (postura, actividad, erizamiento del pelo, aparición de áreas desnudas en la piel o caquexia) empleando una escala de 0-3. Se analizaron los efectos de la 5-AZA sobre la aparición de EICH y la supervivencia de cada grupo experimental. En los momentos indicados se obtuvieron muestras de sangre y, tras el sacrificio del animal, se procesó la MO y bazo para el análisis del quimerismo mediante citometría.

Tras la irradiación y el trasplante, todos los grupos experimentales se mantuvieron en jaulas con covertedor, en aisladores con presión positiva en el animalario de la Universidad de Salamanca.

La solución de 1mg/Kg de peso de 5-AZA se administró a los grupos 3 (MO + 5-AZA) y 5 (EICH + 5-AZA) a través de las venas de la cola del ratón a las 60 y 84 horas posteriores al trasplante y posteriormente los días 15, 21 y 23 postrasplante.

4.2.2.2. *Estudio de expresión proteica de FOXP3 en células T reguladoras murinas.*

Los estudios de expresión proteica de FOXP3 se realizaron 30 días postrasplante en muestras extraídas de sangre periférica y bazo de ratones donadores y receptores.

Las células se recogieron en tubos de citometría y se marcaron con CD4 FITC, CD25 PE y CD45 PerCP/Cy5.5. Tras 15 minutos de incubación a 4°C se lavaron las células con *flow cytometry staining buffer* y se centrifugaron 5 minutos a 2000rpm. Empleamos el kit de *FOXP3 Mouse Regulatory T Cell Staining*, después de retirar el sobrenadante se resuspendieron las células en 1mL de Fixation/Permeabilization buffer. Se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Después de ese tiempo las células se lavaron dos veces con 2mL de la dilución 1:10 de Permeabilization Buffer 10x en agua destilada. A continuación, se añadió 100µL de 1x Permeabilization Buffer y 5µL de FcBlock y se incubaron los tubos 15 minutos a 4°C. Posteriormente se añadieron 5µL del anticuerpo FOXP3 y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Transcurrida media hora se lavaron las células con 2mL de 1x Permeabilization Buffer y se centrifugaron a 2000rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100µL de *flow cytometry staining buffer* para la posterior adquisición de un total de 30000 eventos, en un citómetro FACSCalibur mediante el programa informático CellQuest®. Los eventos se analizaron mediante el programa: Infinicyt 1.1.

4.2.3. Expresión de genes.

4.2.3.1. Estudio del perfil de expresión génica mediante “microarrays”.

Para el estudio del perfil de expresión génica mediante microarrays se cultivaron LT estimulados con anti-CD3 (5 µg/mL) y anti-CD28 (2,5 µg/mL) en presencia o no de 5-AZA 1000 nM durante 2 y 4 días de cultivo.

Se extrajo el ARN utilizando el *AllPrep DNA/RNA Micro Kit*, se midió la concentración y se confirmó la integridad del ARN con el RNA 6000 Nano LabChip utilizando Bionalizador Agilent 2100. A partir de 100 ng de ARN total se sintetizó SPIA™-cDNA (ADN de cadena sencilla sintetizado mediante tecnología propietaria de NuGEN) marcado con biotina según los protocolos de amplificación de dicho fabricante (WT-Ovation™ Pico RNA Amplification System, WT-Ovation™ Exon Module y FL-Ovation™ cDNA Biotin Module V2). El ST-cDNA (*sense transcript cDNA*) marcado se fragmentó y se hibridó (5 µg de cada muestra) sobre el GeneChip Human Gene 1.0 ST siguiendo el manual de su fabricante. Después de la hibridación, se realizó la tinción con estreptavidina-ficoeritrina y anticuerpos anti-estreptavidina biotinilados. Tras las tinciones y lavados, los chips se escanearon con el GeneChip 7G Plus Scanner de Affymetrix.

Tras revisar, con el software Expression Console v. 1.1.2 de Affymetrix, que los chips cumplen criterios de hibridación de buena calidad (valores típicos entre 0.8 y 0.9 de “Pos_vs_neg_auc”, variaciones inferiores al 5% del valor de “All Probe Set Mean” y valores entre 0.3 y 0.7 de “All Probe Set RLE Mean” entre todas las muestras) se realizó la normalización de los datos. Para ello se empleó el algoritmo iterPLIER con

corrección de background (PM-GCBG) que se encuentra integrado en el programa Expression Console. El siguiente paso del procesamiento de datos fue el filtrado estadístico mediante t-test para cada grupo de 3 casos en cada comparación (tratamiento frente a no tratamiento y entre los diversos tiempos de tratamiento). Se eliminaron todas aquellas sondas de baja intensidad (sondas para las que el 100% de las muestras tuvieron una intensidad menor de 100). Se eliminaron también las sondas que apenas presentaron variación entre los arrays, es decir, que la diferencia entre la sonda que presenta mayor intensidad y la que presenta menor intensidad es muy pequeña. Se calculó la media y la desviación estándar para cada uno de los tiempos de tratamiento con 5-azacitidina, utilizando los valores promediados de todos los casos del mismo tiempo para cada probeset. También, para cada una de las posibles comparaciones, se calculó el número de veces que se desregula la expresión (*Fold Change*), mediante la relación con signo (*signed ratio*), entre el valor mayor y el menor, apareciendo como valores negativos los correspondientes a represión y positivos los correspondientes a activación.

Para el análisis no supervisado el algoritmo utilizado fue el agrupamiento jerárquico (*Hierarchical clustering*), con el método de “Máximo Acoplamiento Completo” con distancia euclídea como medida de similaridad y rango de entrada como función de ordenamiento. Este se aplicó con el programa TIBCO Spotfire DecisionSite v. 9.1.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

4.2.3.2. *Estudio de expresión de genes que regulan ciclo celular (p27, p17, p53, p73) y la respuesta inmune (IFN γ , IL-10, FOXO3a, FOXP3) por RQ-PCR.*

Para los estudios de expresión de *p27, p17, p53, p73, IFN γ , IL-10, FOXO3a* y *FOXP3* se cultivaron en placas de 48 pocillos durante 4,5 días de cultivo en presencia o ausencia de 5-AZA 1000nM y en presencia de estímulo anti-CD3 (5 μ g/mL) y anti-CD28 (2,5 μ g/mL).

Se recogieron muestras a las 12h, 36h, 60h y 108 horas de cultivo para extraer el ARN y ADN con el Mini Kit AllPrep DNA/RNA. A continuación se hizo la transcripción reversa según Van Dongen *et al.*⁴⁷ 1 μ g de ARN total se agregó a una mezcla de 20 μ L de volumen final conteniendo hexámeros random y 200U de *Super Script Rnase H reverse transcriptase*. Se incubó a 42°C durante 45 minutos, 3 minutos a 99°C y 30 minutos a 25°C. El ADNc fue almacenado a - 20°C y las alícuotas sobrantes de ARN a - 80°C para posteriores análisis.

Para cuantificar la expresión de los genes se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) con ensayos comerciales TaqMan[®] Gene Expression Assays. Se utilizaron 2 μ L de ADNc que se agregaron a una mezcla con 5 μ L de TaqMan[®] Fast Mater Mix, 2.5 μ L de agua y 0.5 μ L del ensayo de expresión comercial de cada gen en un volumen final de 10 μ L. Las condiciones del termociclador Step One Plus Real-Time PCR System fueron:

50°C-2min, 50ciclos x (95°C-15seg; 60°C-1min).

El ciclo en el cual la reacción superaba un umbral determinando (Ct) sirvió para cuantificar la expresión del gen en estudio respecto a un gen control *ABL1*, por medio de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁴⁸ donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen en estudio}} - Ct_{\text{ABL1}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{LTen cultivo}} - \Delta Ct_{\text{LTcontrol0horas0nM}}$$

Para que un resultado fuera válido, el ciclo umbral (Ct) del gen ABL debía estar entre 21.5 y 29.5 y tener al menos 2000 copias⁴⁹.

4.2.3.3. Estudio de expresión de los genes *GATA-3*, *TBET*, *FOXP3* y *ROR-γ* por RQ-PCR.

Para los estudios de expresión de *GATA-3*, *TBET*, *FOXP3* y *ROR-γ* se cultivaron LT en placas de 48 pocillos durante 11 días de cultivo en presencia o ausencia de 5-AZA 100nM y 1000nM y en presencia de estímulo anti-CD3 y anti-CD28.

Recogimos muestras los días 4, 7 y 11 de cultivo para extraer el ARN y ADN con el Mini Kit AllPrep DNA/RNA. A continuación se hizo la transcripción reversa según Van Dongen *et al.*⁴⁷ como se ha descrito anteriormente.

Para cuantificar la expresión de los genes *GATA-3*, *TBET*, *FOXP3* y *ROR-γ* se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real (RQ-PCR) con ensayos comerciales TaqMan[®] Gene Expression Assays, como se ha descrito en el apartado anterior.

4.2.3.4. Estudios de metilación de los promotores: *TBET*, *GATA-3* y *FOXP3*.

El ADN extraído de LT, cultivados durante 14 días en placas de 48 pocillos en ausencia y en presencia de 5-AZA 100nM y 1000nM y estimulados con anti-CD3 y anti-CD28, fue modificado con bisulfito sódico. Éste método⁵⁰ permite el análisis de la metilación del ADN gracias a la reacción química selectiva en la que el bisulfito sódico

produce una desaminación hidrolítica que convierte a las citosinas no metiladas en uracilo, mientras las citosinas metiladas permanecen como tales. Para ello, el ADN fue desnaturalizado con NaOH y posteriormente incubado durante 16 horas con el antioxidante hidroquinona y bisulfito sódico. Tras este período se purificó el ADN con el kit comercial *DNA clean up system* y se precipitó con acetato amónico, glucógeno, etanol absoluto y etanol al 70%.

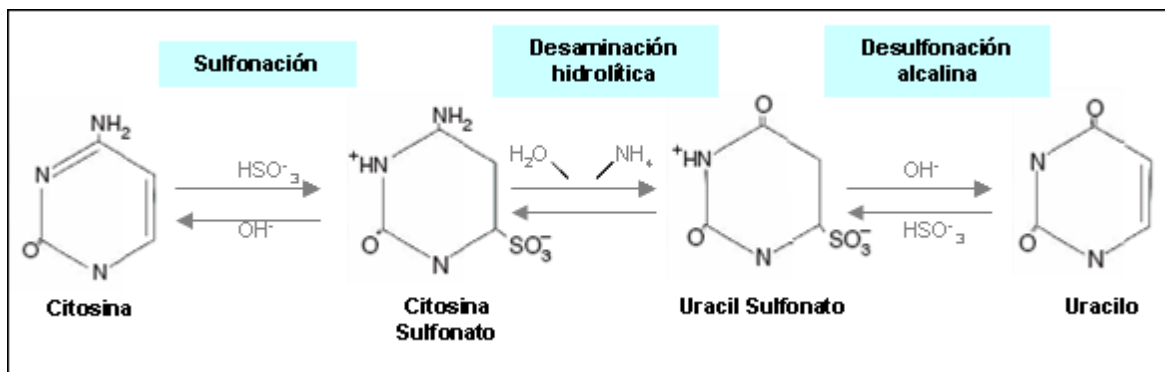


Figura 11: Para el análisis de metilación del ADN, se inducen 3 reacciones químicas: sulfonación-desaminación hidrolítica y desulfonación alcalina para la conversión de las cisinas no metiladas en uracilo.

La secuenciación de bisulfito se realizó para cuantificar las CpGs metiladas. El fragmento de interés fue amplificado por PCR empleando cebadores que flanquean la isla CpG, pero que carecen de éste dinucleótido en su secuencia de hibridación.

El diseño de primers se realizó mediante el programa Methyl Primer Express v1.0. El producto de PCR se separó en un gel de agarosa al 2% (p/v) en TBE, y posteriormente se extrajeron las bandas de ADN de interés con el kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*. El fragmento amplificado fue ligado por acción de la ligasa T4 en el vector “pGEM-T Easy vector” y el producto de la ligación fue clonado mediante choque térmico en bacterias competentes. Con el sistema de selección del

operón lacZ, fue posible discriminar entre colonias que habían incorporado el vector vacío (azules) y aquellas que incorporaron el vector junto con el fragmento de interés (blancas). Se seleccionaron 12 colonias blancas y se incubaron en medio LB low SALT con ampicilina. Se extrajo el ADN de las bacterias usando el kit *Plasmid DNA Purification. NucleoSpin Multi-96 Plus Plasmid* y se amplificó el fragmento mediante PCR y cebadores para T7. Finalmente se realizó una purificación con el *Big Dye Xterminator Purification Kit* y se obtuvieron las secuencias en el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer que posteriormente fueron analizadas con el programa BioEdit 7.0.9.

Los estudios de metilación se han realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Ballestar del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL) en Barcelona.

4.2.4. *Modulación de la expresión de PRAME con 5-azacitidina.*

4.2.4.1. *Estudio de expresión de PRAME en blastos.*

Los aspirados de la médula ósea se realizaron en pacientes de LMA, en todos los casos bajo anestesia local. Se utilizaron tubos estériles a los que se añadió heparina libre de aditivos reconstituida con agua destilada estéril. Todos los pacientes de LMA fueron debidamente informados y el procedimiento se realizó de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca.

La muestra de médula ósea se diluyó 1:2 con suero fisiológico y se separó la fracción mononucleada mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll. Las células se centrifugaron a 1600rpm durante 30min. Transcurrido este tiempo se obtuvo

una interfase de células mononucleadas que se separó mediante el uso de pipetas pasteur estériles y que posteriormente se lavó 2 veces con la solución HANKS. Una vez separada la capa mononucleada y llevado a cabo el recuento celular, los blastos tumorales se marcaron según su fenotipo, estudio previamente realizado por la Unidad de Inmunopatología del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. En un citómetro de flujo FACS Aria, se separó la población de células tumorales: CD45⁺/Anexina⁻/7AAD⁻/CD33⁺ ó CD45⁺/Anexina⁻/7AAD⁻/CD34⁺, según el fenotipo de los blastos del paciente.

Una vez realizada la separación de la población de interés, resuspendimos las células en medio de cultivo y las sembramos a una concentración de 1x10⁶ células/mL. Se cultivaron las células en presencia o ausencia de 5AZA 100nM y 1000nM durante 4 días.

Al cabo de 4 días de cultivo se recogieron las células para extraer su ARN y ADN con el Micro Kit AllPrep DNA/RNA. El ARN lo retrotranscribimos a ADNc para posteriormente hacer los estudios de expresión de *PRAME* por RQ-PCR con ensayos comerciales TaqMan[®] Gene Expression Assays.

Las condiciones del termociclador Step One Plus Real-Time PCR System fueron:

50°C-2min, 50ciclos x (95°C-15seg; 60°C-1min).

El ciclo en el cual la reacción superaba un umbral determinando (Ct) sirvió para cuantificar la expresión del gen *PRAME* en estudio respecto a un gen control *ABLI*, por medio de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde:

$$\Delta Ct = Ct_{PRAME} - Ct_{ABLI}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Blastos en cultivo}} - \Delta Ct_{\text{Blastos control 0 horas 0nM}}$$

Para que un resultado fuera válido, el ciclo umbral (Ct) del gen ABL debía estar entre 21.5 y 29.5 y tener al menos 2000 copias⁴⁹.

4.2.4.2. Estudio de expresión de *PRAME* en $CD34^+$ de donantes sanos.

Se realizó a partir de aféresis de progenitores hematopoyéticos movilizados a sangre periférica de donantes sanos. La movilización de las células progenitoras desde médula ósea a sangre periférica se llevó a cabo tras la administración a los donantes de G-CSF, a dosis estándar de 5µg/Kg/12h durante al menos cuatro días. El proceso de aféresis comenzó en el día +5 y se realizó en el sistema de aféresis Cobe SpectraTM. El concentrado celular se lavó 2 veces con HANKS, se filtró para deshacer posibles grumos y se llevó a cabo el recuento celular en cámara de Neubauer. Una vez calculado el número de células se procedió a la selección positiva inmunomagnética en el AutoMacs^{PRO} utilizando el kit de aislamiento de células progenitoras $CD34^+$. A continuación se contaron las células $CD34^+$ obtenidas y se sembraron en placas de 48 pocillos 5×10^5 células/500µL en presencia o ausencia de 5-AZA a una concentración de 1000nM. Al cabo de 4 días de cultivo se recogieron las células para extraer su ARN y ADN con el Micro Kit AllPrep DNA/RNA. El ARN lo retrotranscribimos a ADNc para posteriormente hacer los estudios de expresión de *PRAME* por RQ-PCR con ensayos comerciales TaqMan[®] Gene Expression Assays, como se describe en el apartado anterior.

4.2.4.3. *Estudio de metilación de PRAME en blastos y en CD34⁺.*

Los blastos de pacientes de LMA y las células CD34⁺ procedentes de aféresis de donantes sanos fueron tratadas durante 4 días de cultivo con 5-AZA 1μM. Posteriormente se extrajo su ADN y se realizaron los estudios de metilación como se describe en el apartado 4.2.3.4.

4.2.5. *Análisis estadístico.*

Se calcularon la media/mediana siempre para cada variable. Para evaluar el efecto del fármaco sobre las distintas variables analizadas se empleó el test ANOVA o la T de student para datos pareados.

La supervivencia de los ratones 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 del peso de los ratones postrasplante 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 10.0 Inc. Chicago IL. USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

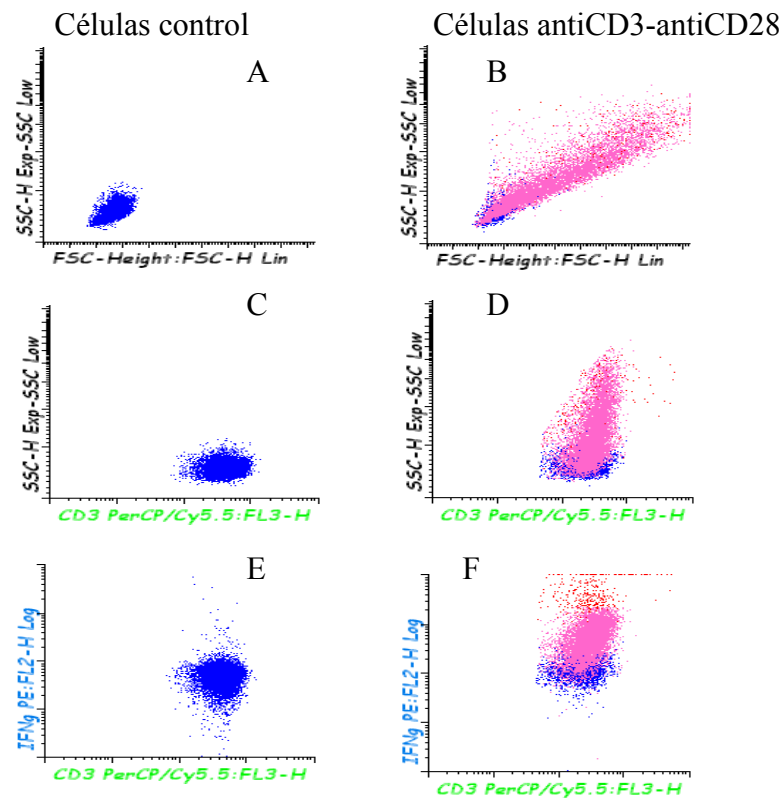
5. RESULTADOS

5.1. Estudio del efecto de la 5-AZA sobre los LT y su posible uso en el trasplante hematopoyético.

5.1.1. Efecto de la 5-AZA sobre la activación de los LT.

En primer lugar se estudió la activación linfocitaria a partir de buffy coat. Para ello se obtuvieron las células mediante separación por gradiente de densidad con ficoll y se mantuvieron en cultivo durante 2 y 4 días en placas de 48 y 96 pocillos.

En la figura 12 puede observarse cómo la estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 aumenta el tamaño y la granularidad de los LT (B,D) así como la expresión de INF- γ , CD25 y CD40L (panel F, H, J).



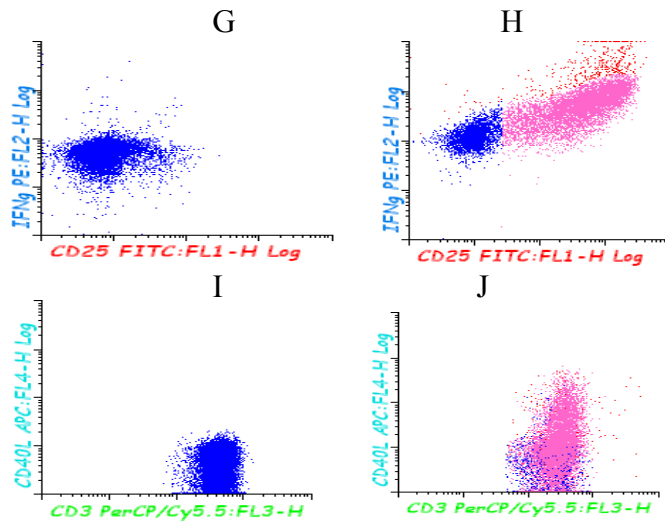


Figura 12: Estudio por citometría de LT en ausencia de estímulos (columna izquierda) o estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 tras dos días de cultivo (columna derecha). $n=11$

Como se aprecia en la figura 13, la presencia de 5-AZA 1000nM en el cultivo, disminuyó la activación y proliferación linfocitaria, como se constata por el menor tamaño y complejidad de los linfocitos estimulados (figuras 13A y D), la menor expresión de CD25 y de IFN- γ (figuras 13B y E) y la menor expresión de CD40L (figuras 13C y F) en presencia del fármaco.

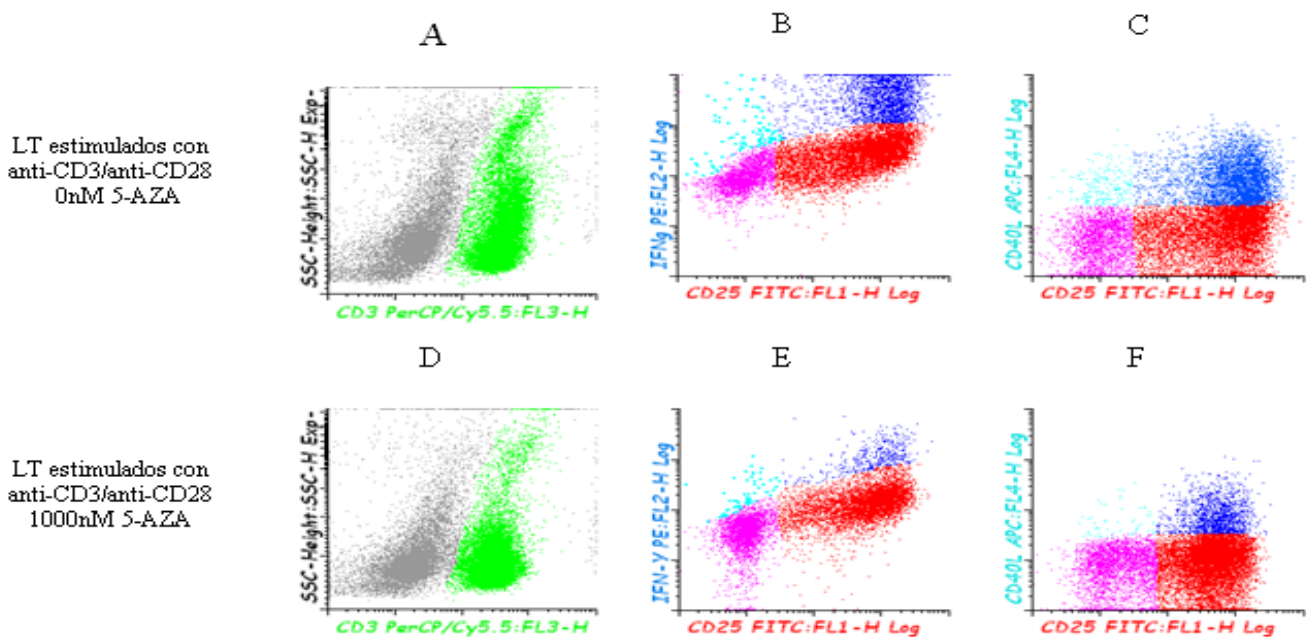


Figura 13: Activación de los linfocitos T cultivados durante 2días y estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o no de 5-AZA 1000nM.

Las figuras 14 y 15 muestran un evidente efecto dosis-respuesta para los diferentes marcadores de activación analizados.

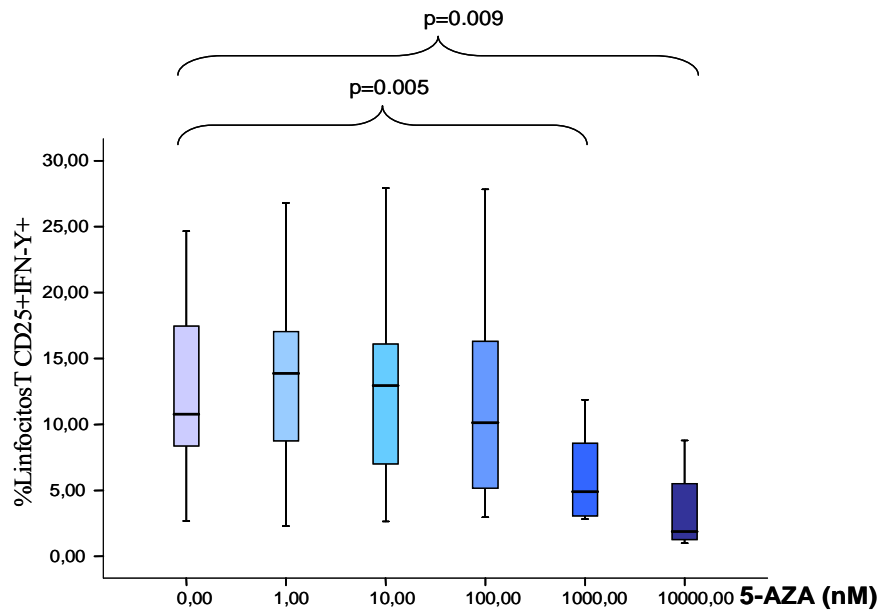


Figura 14: Representación estadística del porcentaje de LT CD25+IFN- γ + tras 2 días de cultivo con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de 5-AZA a distintas concentraciones (0, 1, 10, 100, 1000 y 10000 nM). n=11

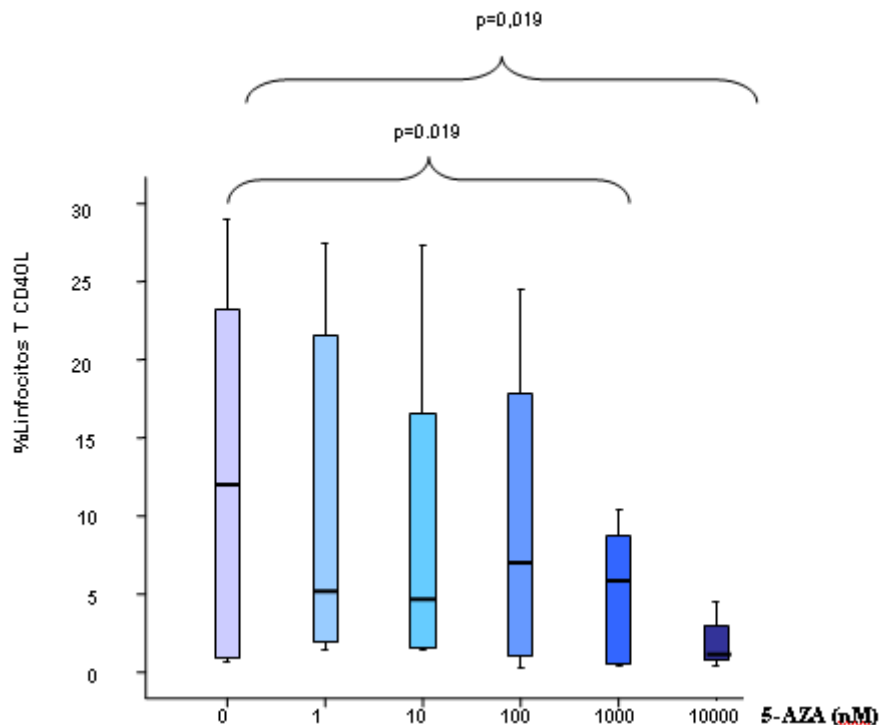


Figura 15: Representación estadística del porcentaje de LT CD40L+ tras 2 días de cultivo estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de 5-AZA a distintas concentraciones (0, 1, 10, 100, 1000 y 10000 nM). n=11

Como se puede observar, la presencia de 5-AZA 1000nM en el cultivo disminuyó de manera significativa el porcentaje de linfocitos CD25+IFN- γ + (figura 14), así como la expresión de CD40L (figura 15).

5.1.2. Efecto de la 5-AZA sobre la producción de citocinas.

Posteriormente, analizamos el efecto de la 5-AZA sobre la secreción de citocinas por linfocitos T. Para ello, estimulamos la células con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de 5-AZA 1000nM y a los 4 días se estudiaron los niveles de citocinas en el sobrenadante del cultivo mediante CBA.

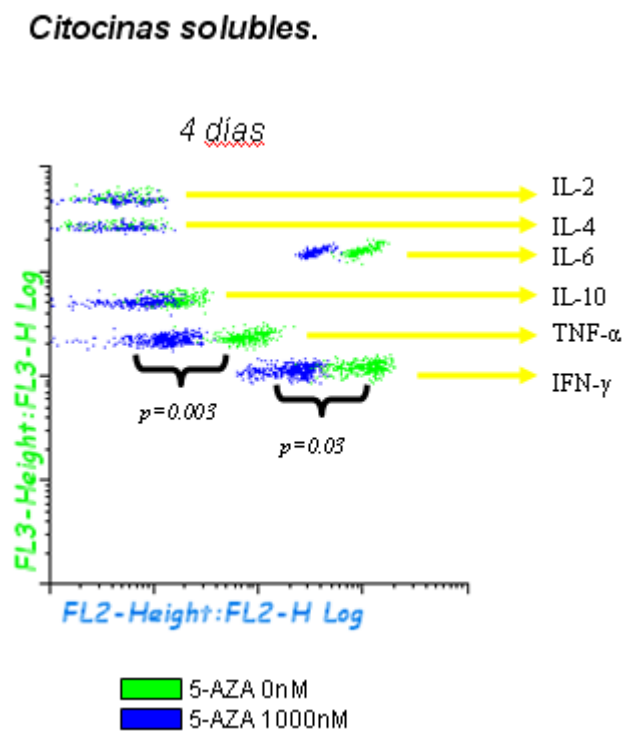


Figura 16: Representación de la producción de citocinas solubles en cultivo de Linfocitos T estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 durante 4 días de cultivo en ausencia y presencia de 5-AZA 1000nM en el medio de cultivo.

Como se puede apreciar en la figura 16, en los cultivos con 5-AZA hubo un descenso significativo de IFN- γ y TNF- α ; también disminuyó la producción de IL-6 e IL-10, mientras que la producción de IL2 e IL-4 se mantiene prácticamente sin variación.

5.1.3. Efecto de la 5-AZA sobre la viabilidad de los LT.

Con el fin de comprobar si la inhibición de la activación linfocitaria inducida por la 5-AZA se debía a un efecto sobre la viabilidad linfocitaria, se analizó la misma en linfocitos T en las diferentes condiciones de cultivo.

En los cultivos estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 y tratados con 5-AZA se mantiene la viabilidad celular, hasta concentraciones de 1000nM. Por encima de esa concentración, se aprecia un descenso significativo de la viabilidad (Figura 17).

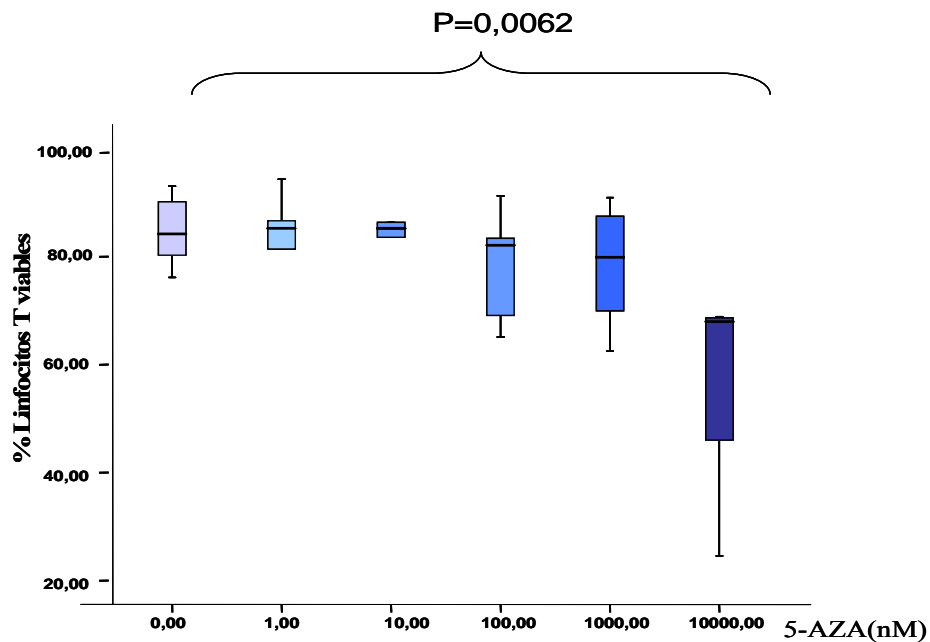


Figura 17: Representación estadística del porcentaje de LT viables (Anexina/7-AAD) estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 durante 2 días de cultivo en presencia de 5-AZA a distintas concentraciones (0, 1, 10, 100, 1000 y 10000 nM). $n=11$

Es interesante destacar que la presencia de 5-AZA 1000nM en el cultivo disminuyó apreciablemente el porcentaje de linfocitos T activados sin afectar significativamente la viabilidad celular.

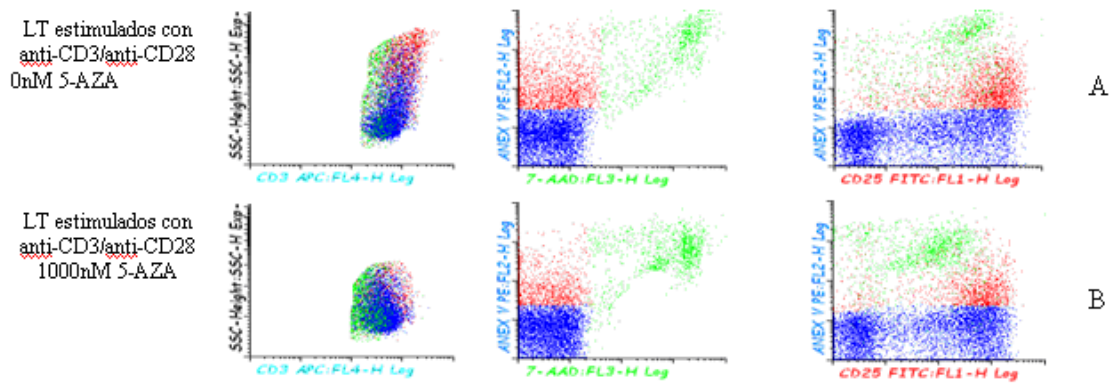


Figura 18: Estudio por citometría de flujo de la viabilidad de los linfocitos T estimulados durante 2 días con anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia (A) o presencia (B) de 5-AZA 1000nM.

5.1.4. Efecto de la 5-AZA sobre la proliferación y el ciclo celular de los LT.

Analizamos también el efecto de la 5-AZA sobre la proliferación de los LT. Para ello, marcamos las células con PKH (colorante verde fluorescente que se incorpora a la membrana celular) y las cultivamos durante 4 días en ausencia de estímulo (A), estimuladas con PHA (B) y estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28(C) en ausencia y presencia de 5-AZA 100nM y 1000nM.

Al cabo de 4 días se analizaron los cultivos por citometría de flujo, analizando la expresión de CD3, CD25, captación de 7AAD y la intensidad de fluorescencia de PKH que es inversamente proporcional a la proliferación celular. Cada pico corresponde a una división celular.

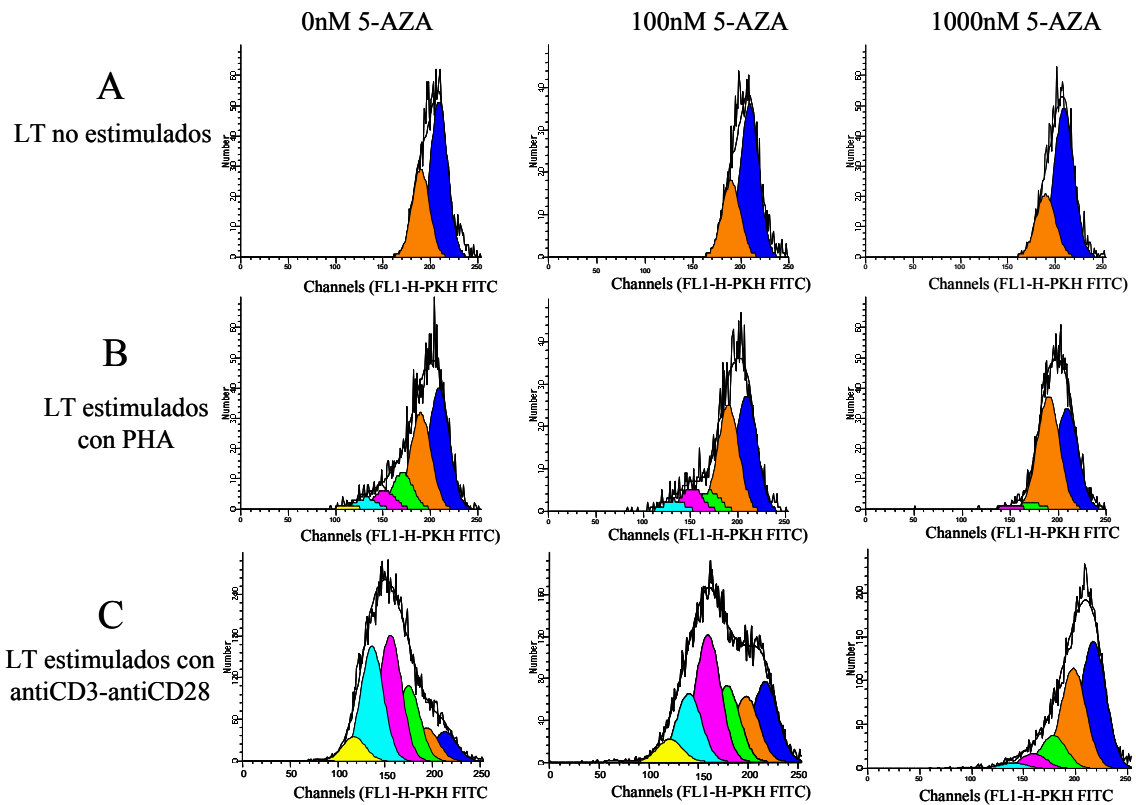


Figura 19: Proliferación de linfocitos T no estimulados (A), estimulados con PHA (B) y estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 (C) durante 4 días en ausencia o en presencia de 5-AZA 100Nm y 1000nM.

Como se observa en la figura 19, la adición de 5-AZA al cultivo disminuyó la proliferación de las células estimuladas con PHA y con anti-CD3 y anti-CD28.

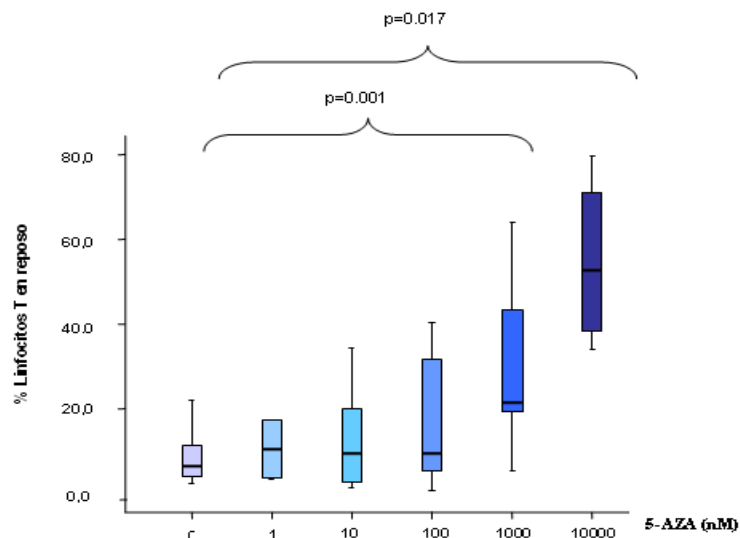


Figura 20: Representación estadística mediante box-plot del porcentaje de LT en reposo tras estimulación con anti-CD3 (5µg/mL) y anti-CD28 (2,5µg/mL) durante 2 días de cultivo en presencia de 5-AZA a distintas concentraciones (0, 1, 10, 100, 1000 y 10000 nM.). n=11

El análisis estadístico de los 11 casos realizados se muestra en la figura 20, donde se aprecia un claro efecto dosis respuesta, aumentando el porcentaje de linfocitos en reposo a medida que se incrementa la dosis de 5-AZA.

Finalmente, el análisis del ciclo celular mostró cómo en los cultivos de LT estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 y tratados con 5-AZA 1000nM tras 4 días de cultivo se producía un descenso significativo en el porcentaje de células en fase S (37% *versus* 0,3%) y en fase G₂M (3,3 *versus* 0%).

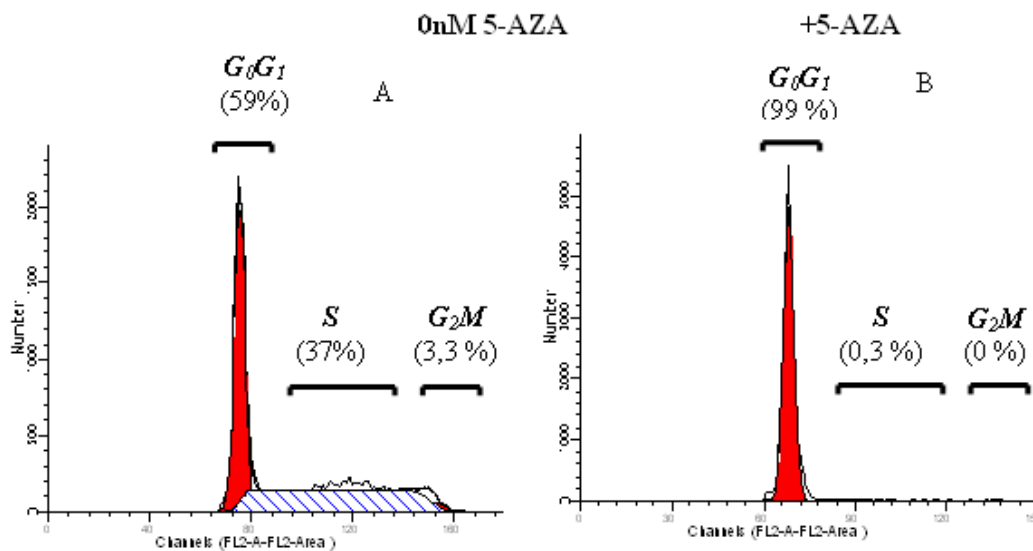


Figura 21: Ciclo celular de los Linfocitos T estimulados con anti- CD3 y anti-CD28 durante 4 días en ausencia (A) o presencia de 5-AZA 1000nM (B).

5.1.5. Efecto de la 5-AZA sobre el perfil de expresión génica.

Se realizaron estudios de expresión génica mediante microarrays en LT estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o no de 5-AZA 1000nM durante 2 y 4 días de cultivo. En estos estudios tras el análisis no supervisado, se evidenció en el

agrupamiento jerárquico (*Hierarchical clustering*, Figura 22) que los LT cultivados en presencia del fármaco tenían 7149 genes desregulados tras 2 días (Figura 22-1a) y 4 días de cultivo (Figura 22-1b). Posteriormente después del filtrado *Full Discovery Rate* (FDR) se evidenciaron 170 genes desregulados tras 2 (Figura 22-2a) y 4 días de cultivo (Figura 22-2b).

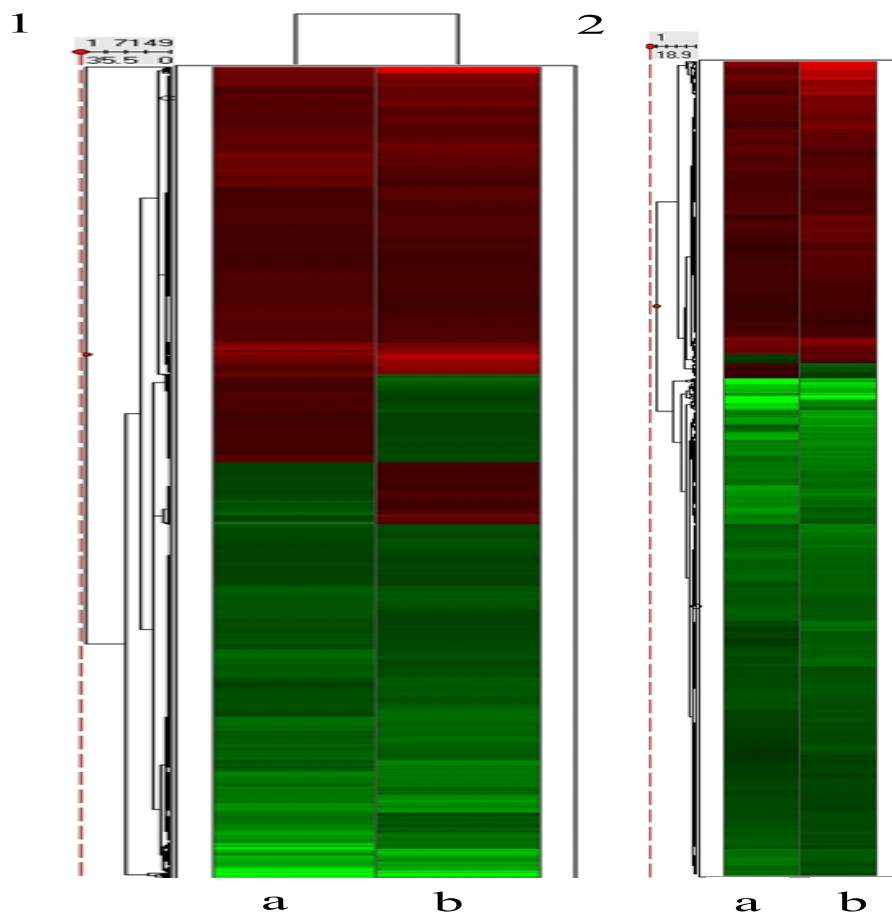


Figura 22: Desregulación de 7149 genes durante 2 días (Fig 22-1a) y 4 días de cultivo (Fig 22-1b) y tras el FDR desregulación de 170 genes al cabo de 2 días (Fig 22-2a) y 4 días de cultivo (Fig 22-2b).

En rojo están los genes que se sobreexpresan y en verde aquellos que se infraexpresan tras el tratamiento con 5-azacitidina 1000nM.

El análisis de conglomerados jerárquico (*Hierarchical clustering*, Fig22) lo realizamos como “Máximo Acoplamiento Completo” con distancia euclídea como

medida de similitud y rango de entrada como función de ordenamiento con el programa TIBCO Spotfire DecisionSite v.9.1.3. A continuación realizamos un análisis de redes de interacción génica basado en APID⁵¹ (Fig 23), utilizando APID2NET⁵², y representando los resultados con Cytoscape v2.6⁵³

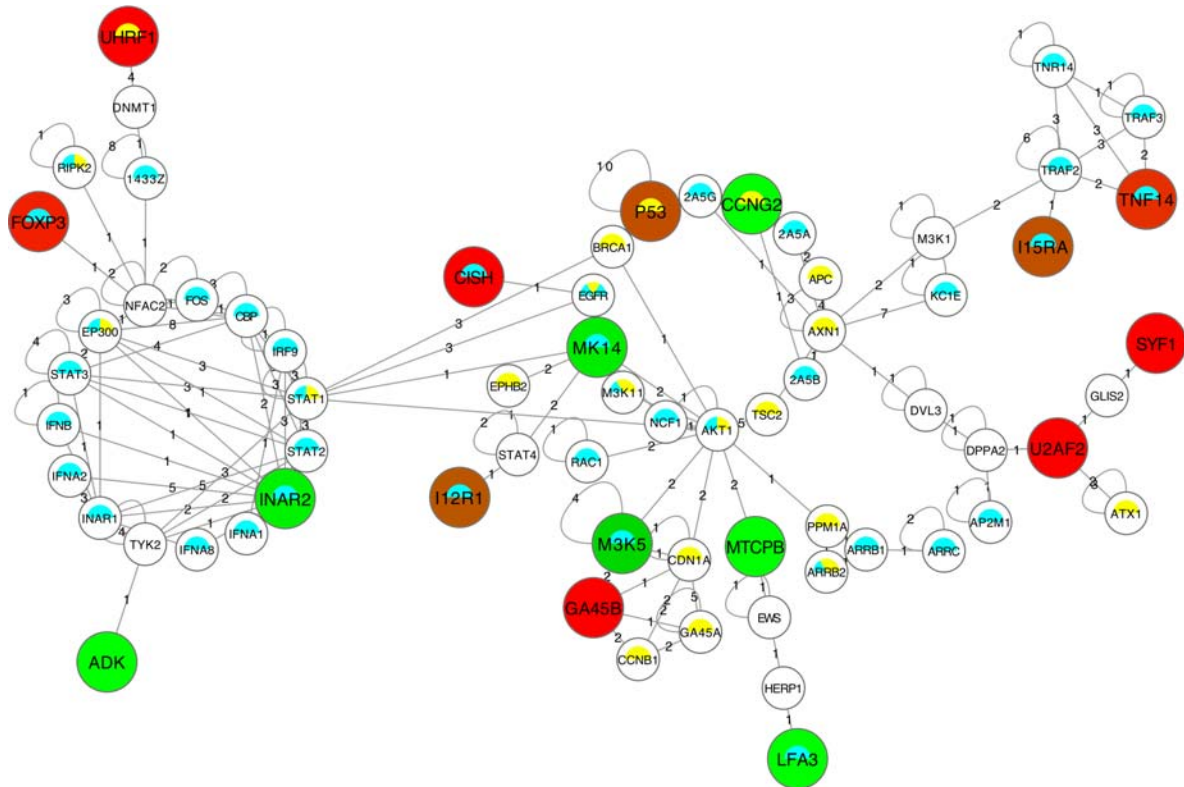


Figura 23: Representación de los genes que están desregulados en presencia de 5-AZA 1000nM durante 2 y 4 días de cultivo.

En la figura 23 vemos con un semicírculo azul los genes desregulados involucrados en la respuesta inmune y con un semicírculo amarillo los que están relacionados con el ciclo celular.

La desregulación de genes relacionados con la respuesta inmune y con el ciclo celular justificaría los resultados obtenidos por citometría de flujo en los que hemos visto como la presencia de 5-AZA 1000nM disminuye: la activación y proliferación linfocitaria, la producción de citocinas inflamatorias como INF- γ ó TNF- α y bloqueo del ciclo celular.

5.1.6. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión de genes que regulan el ciclo celular.

Analizamos la expresión de genes que regulan el ciclo celular mediante RQ-PCR en linfocitos T estimulados con anti-CD3y anti-CD28 cultivados durante 12, 36, 60 y 108 horas en presencia y ausencia de 5-azacitidina 1 μ M.

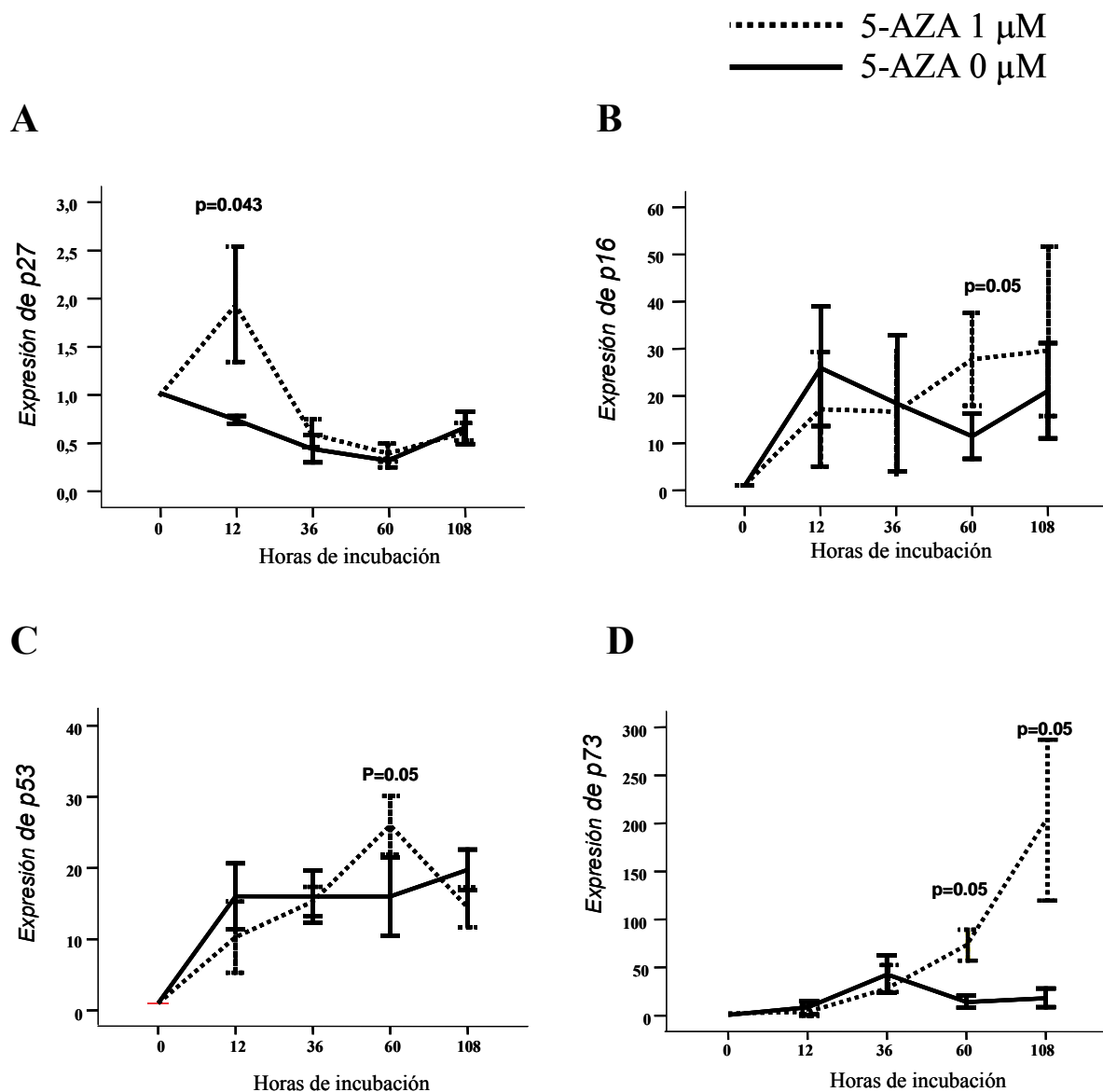
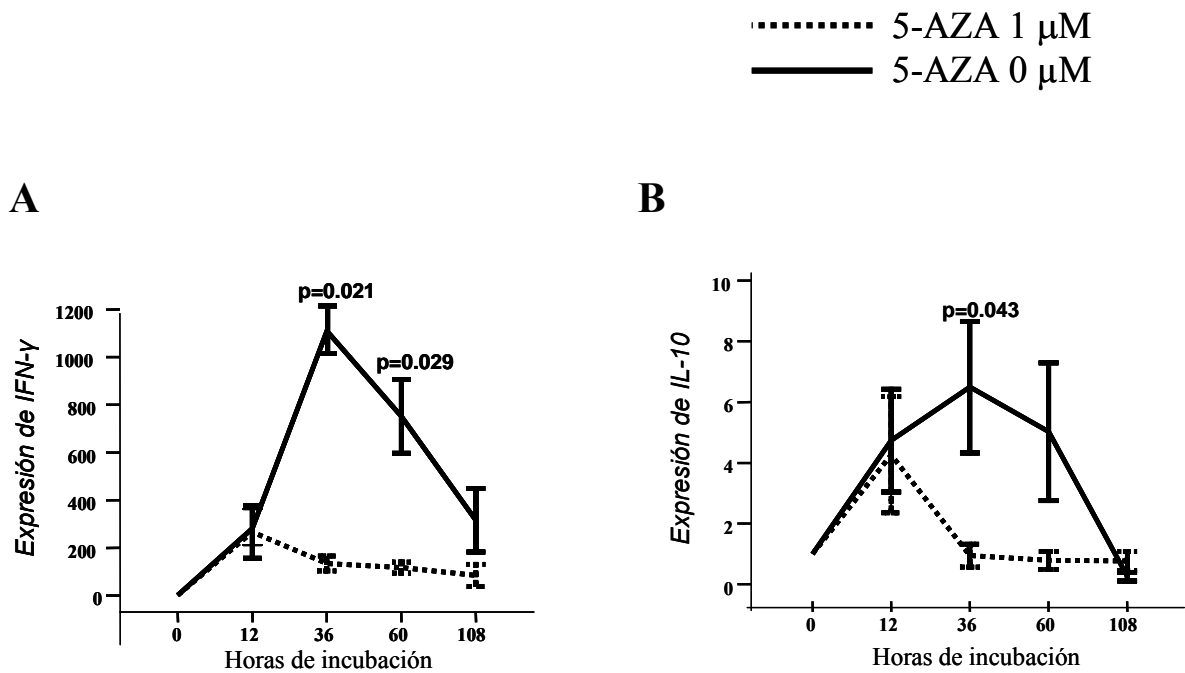


Figura 24: Expresión de genes que regulan ciclo celular: p27 (A), p16 (B), p53 (C) y p73 (D) en LT en cultivo estimulados con anti-CD3 (5 μ g/mL) y anti-CD28(2, 5 μ g/ml) en presencia o ausencia de 5-AZA a una concentración de 1 μ M en el medio de cultivo durante 4 días.

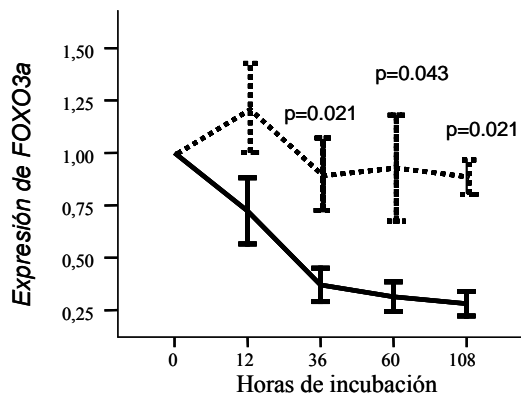
En la figura 24 podemos ver como en presencia de 5-AZA se sobreexpresan de forma estadísticamente significativa *p27* a las 12 horas, *p16* y *p53* a las 60 horas y *p73* a las 60 y 108 horas. Estos genes están implicados en la parada y control del ciclo celular.

5.1.7. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión de genes que regulan la respuesta inmune.

Analizamos la expresión de genes que regulan la respuesta inmune mediante RQ-PCR en linfocitos T estimulados con anti-CD3y anti-CD28 cultivados durante 12, 36, 60 y 108 horas en presencia y ausencia de 5-azacitidina 1 μ M.



C



D

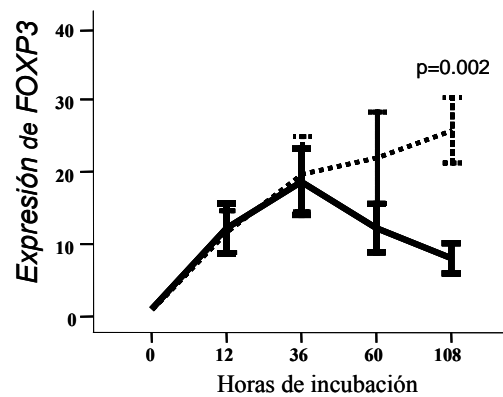


Figura 25 : Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune: *IFN- γ* (A), *IL-10* (B), *FOXO3a* (C) y *FOXP3* (D) en LT en cultivo estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de 5-AZA a una concentración de $1\mu\text{M}$ en el medio de cultivo durante 4,5 días.

En la figura 25 podemos ver como en presencia de 5-AZA se infraexpresan de forma estadísticamente significativa los genes de las citocinas *IFN- γ* en cultivo e *IL-10* durante las 36 y 60 horas de cultivo. *FOXO3a*, gen involucrado en apoptosis y desregulación de genes necesarios para la muerte celular en células tumorales, se sobreexpresa de forma estadísticamente significativa a partir de las 36 horas en cultivo y *FOXP3*, relacionado con la respuesta inmune reguladora, a partir de las 108 horas de cultivo.

5.1.8. Efecto de la 5-AZA en un modelo murino de EICH severo.

A continuación analizamos el efecto de la 5-AZA sobre la supervivencia y desarrollo de EICH de ratones BALB/C trasplantados con MO y esplenocitos de ratones C57BL/6.

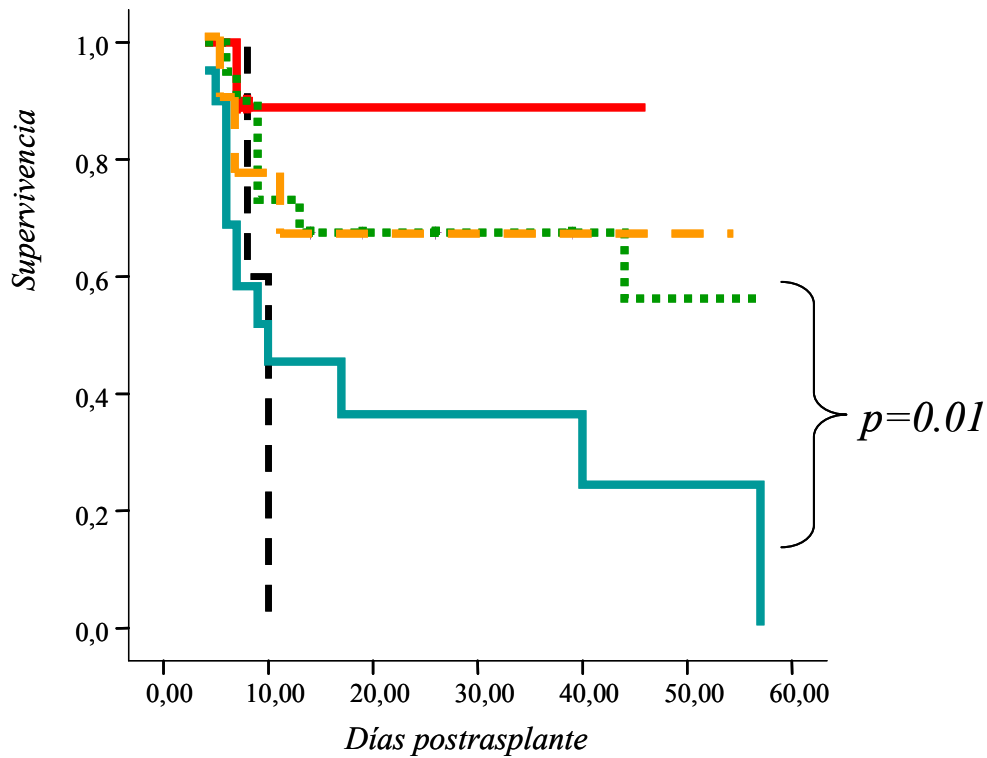


Figura 26: Supervivencia de los ratones desde el día 0 al día 60.

- MO
- MO + LT
- ⋯ MO + LT + 5-azaC a 60h y 84h postrasplante
- · - MO + LT + 5-azaC a 60h y 84h postrasplante y en días +19, +21 y +23 postrasplante
- · - Control de irradiación

En primer lugar, comprobamos que la 5-AZA no ejerce un efecto citotóxico sobre la hematopoyesis del ratón trasplantado. A continuación, evaluamos su efecto sobre el desarrollo de la enfermedad injerto contra huésped. La 5-AZA administrada a 60 y 86 horas tras la infusión de MO + esplenocitos aumentó de manera significativa la supervivencia de los ratones. Los ratones tratados con 5-AZA desarrollaron menos enfermedad injerto contra huésped y éste fue menos severo, como se comprueba en la figura 27 en la que se observa cómo los ratones trasplantados y tratados con 5-azacitidina tienen una menor pérdida de peso (A), una postura menos encorvada (B) mejor integridad del pelo y la piel (C,D), y mayor actividad (E).

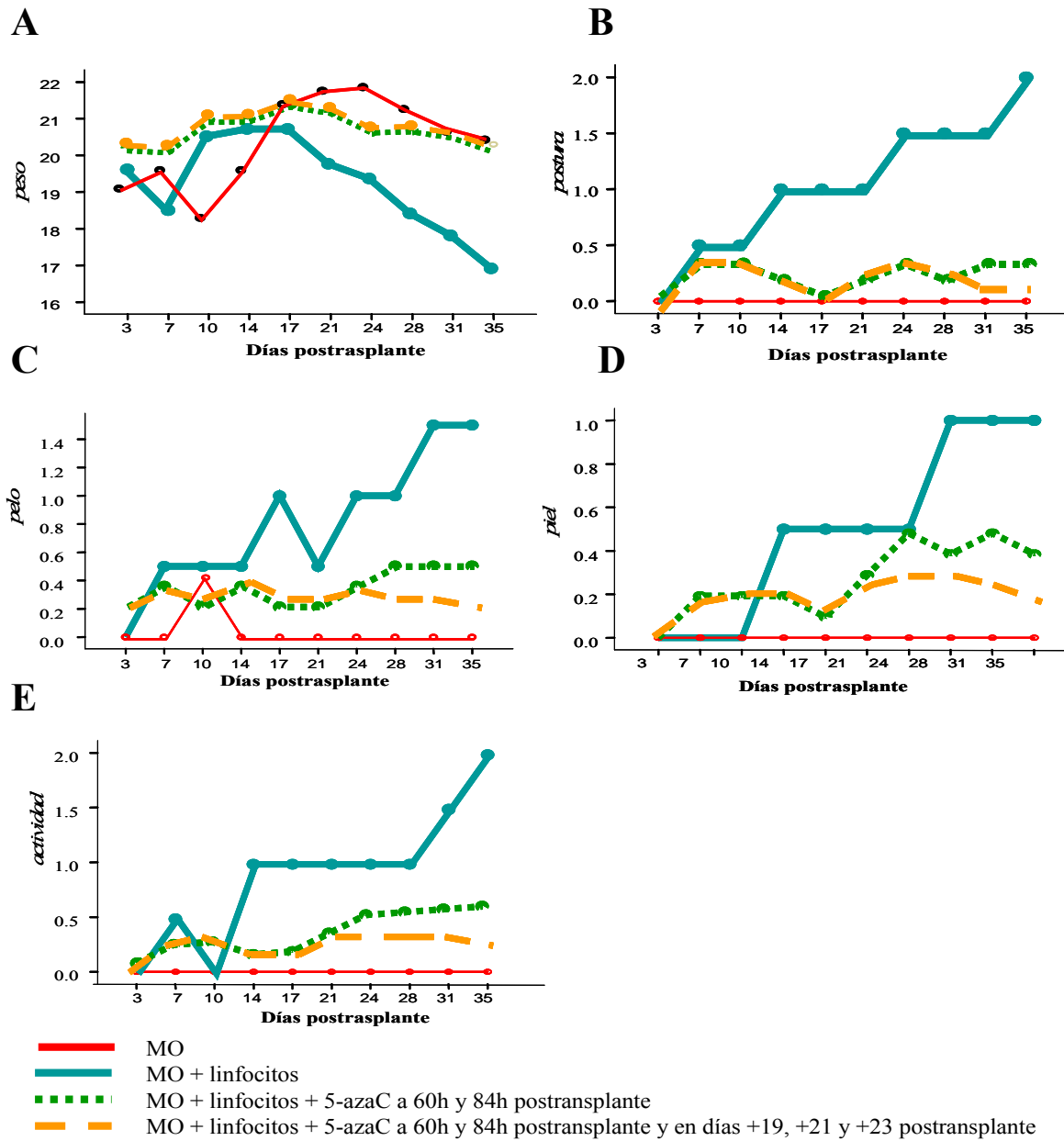


Figura 27: Pérdida de peso (A), postura (B), integridad del pelo y la piel (C,D) y actividad (E) de los ratones.

5.1.9. Efecto de la 5-AZA sobre células T reguladoras en ratones BALB-C.

Con el fin de comprobar si la 5-AZA favorecía la expansión de células T reguladoras en los ratones BALB/C trasplantados con médula ósea y esplenocitos de ratones C57BL/6 y tratados con 5-AZA, analizamos por citometría de flujo la expresión proteica de FOXP3 en sangre periférica y en bazo de los ratones BALB/C. Para este estudio se marcaron los linfocitos T con la siguiente combinación de anticuerpos monoclonales: CD4/CD25/CD45/FOXP3.

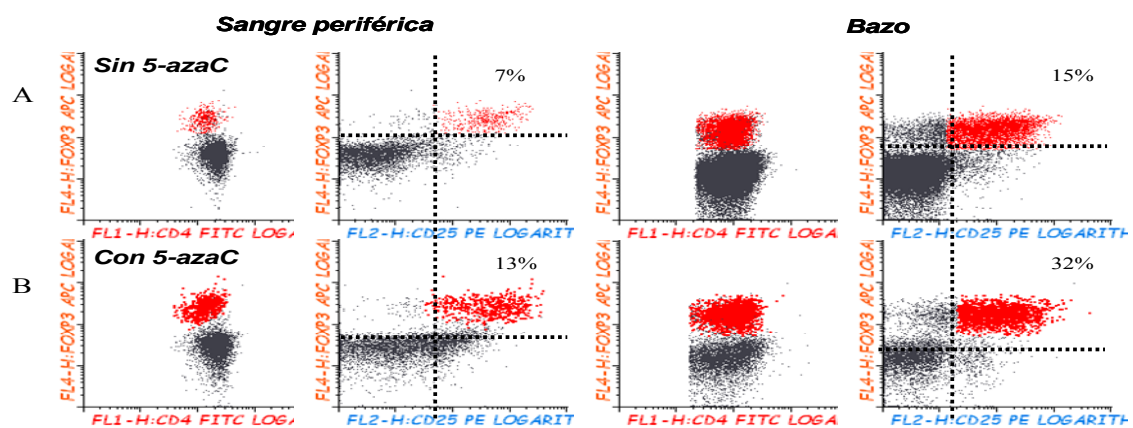


Figura 28: Efecto de la 5-azacitidina sobre el número de células T reguladoras en sangre periférica y en bazo en ratones C57BL/6 (A) y en ratones BALB/C (B) trasplantados con médula ósea y esplenocitos de C57BL/6 y tratados con 5AZA a las 60 y 84 horas y los días 19, 21 y 23 postrasplante.

En la figura 28 podemos ver como los ratones CD7BL/6 tienen un 7% de células T reguladoras en sangre periférica y un 15% en bazo mientras que los ratones BALB/C postrasplante y tratados con 5-AZA tienen un 13% en sangre periférica y un 32% en bazo de células T reguladoras.

5.1.10. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión de los genes *TBET*, *GATA-3*, *ROR- γ* y *FOXP3*.

Analizamos a continuación la expresión de genes que dirigen la respuesta inmune hacia Th1 (*TBET*), Th2 (*GATA3*), Th17 (*ROR- γ*) ó Treg (*FOXP3*) mediante RQ-PCR en linfocitos T estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 cultivados durante 11 días en presencia y en ausencia de 5-AZA 100nM.

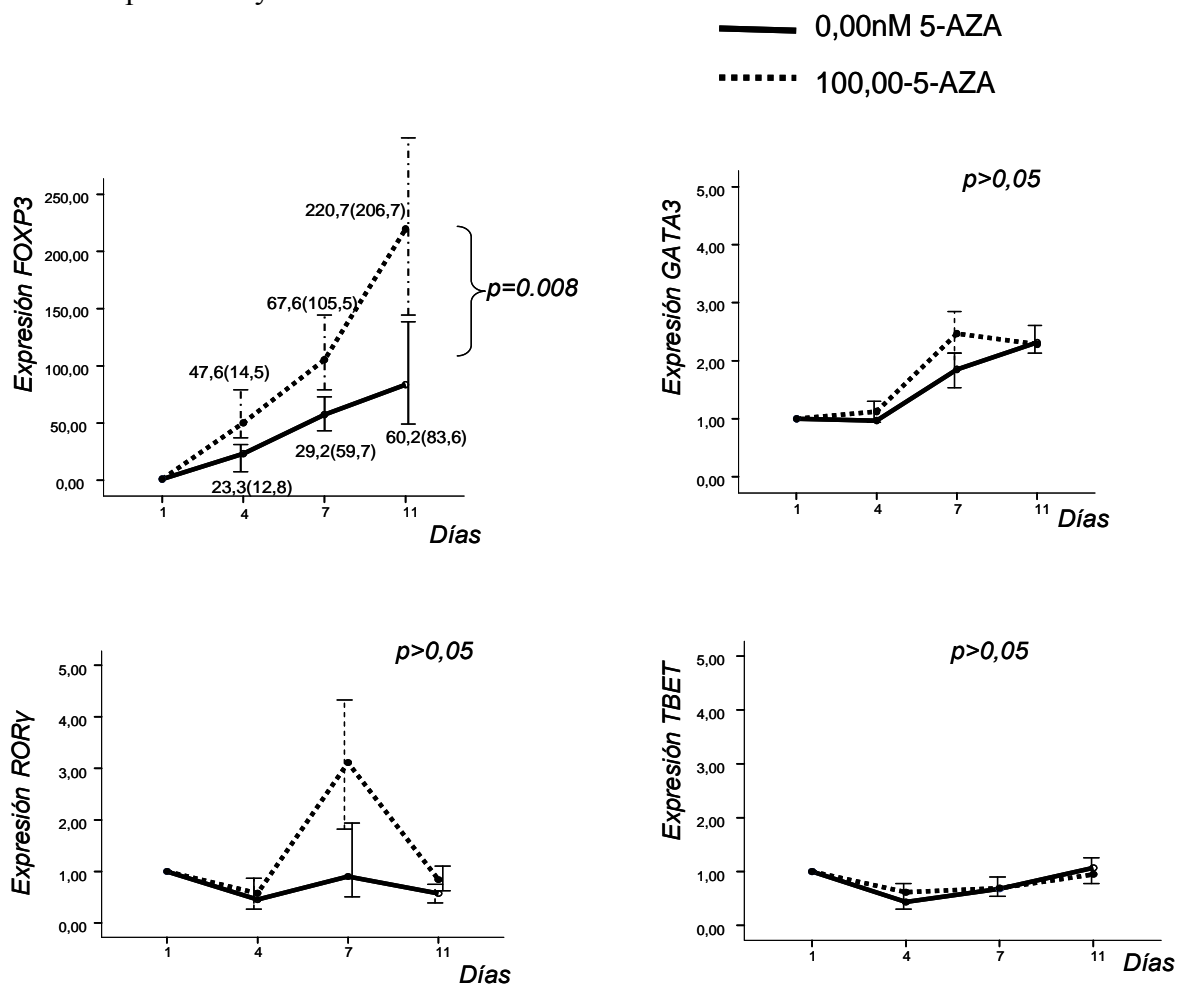


Figura 29: Expresión de genes que regulan la respuesta inmune hacia Th1(*TBET*), Th2 (*GATA3*), Th17 (*ROR- γ*) ó Treg (*FOXP3*) en LT estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia o ausencia de 5-AZA 100nM durante 11 días de cultivo.

En la figura 29 vemos cómo en presencia de 5-AZA la expresión de *TBET*, *GATA3* y *ROR- γ* no se modifica de manera significativa mientras que *FOXP3*, a partir

del día 11 está sobreexpresado de manera significativa. Este hallazgo está en consonancia con los resultados mencionados anteriormente.

5.1.11. Efecto de la 5-AZA sobre la metilación del promotor de *FOXP3*.

Con el fin de estudiar a través de qué mecanismos se estaba produciendo este efecto sobre la expresión génica, analizamos el estado de metilación a partir del ADN de los LT en cultivo durante 14 días estimulados con anti-CD3 y anti-CD28, en ausencia y presencia de 5-AZA 100nM.

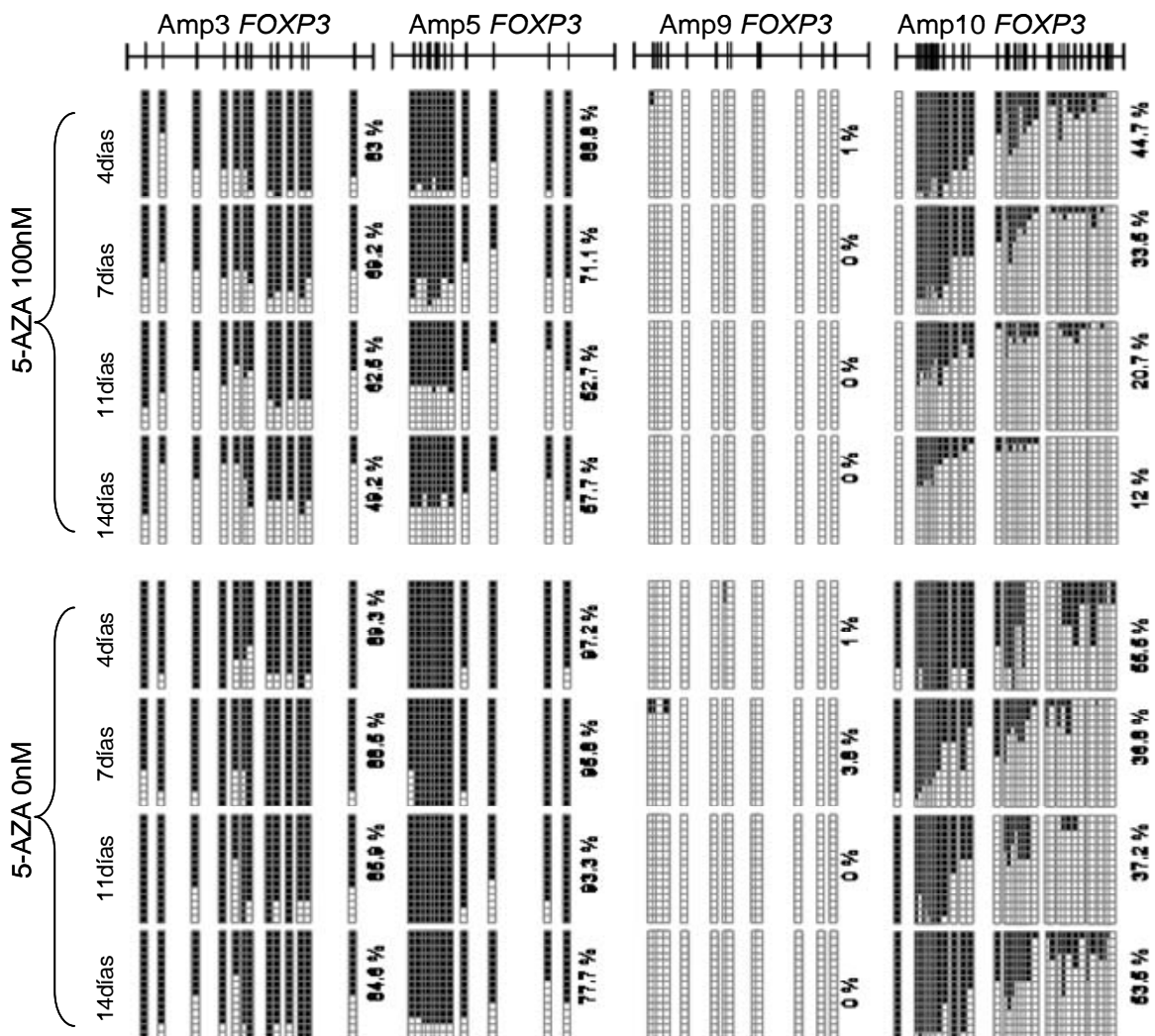


Figura 30: Representación del porcentaje de metilación de los amplicones 3, 5, 9 y 10 del promotor de *FOXP3* de LT estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia y presencia de 5-AZA 100nM los días 4, 7, 11 y 14 de cultivo.

En la figura 30 podemos ver como en presencia de 5-AZA 100nM el porcentaje de metilación va disminuyendo a lo largo del cultivo de un 83 a un 49,2%, de un 88,8 a un 57,7% y de un 44,7 a un 12% de en los amplicones 3, 5 y 10 respectivamente, del promotor de *FOXP3*. Por el contrario, en los mismos amplicones en ausencia del fármaco el estatus de metilación prácticamente no cambia a lo largo de los 14 días de cultivo.

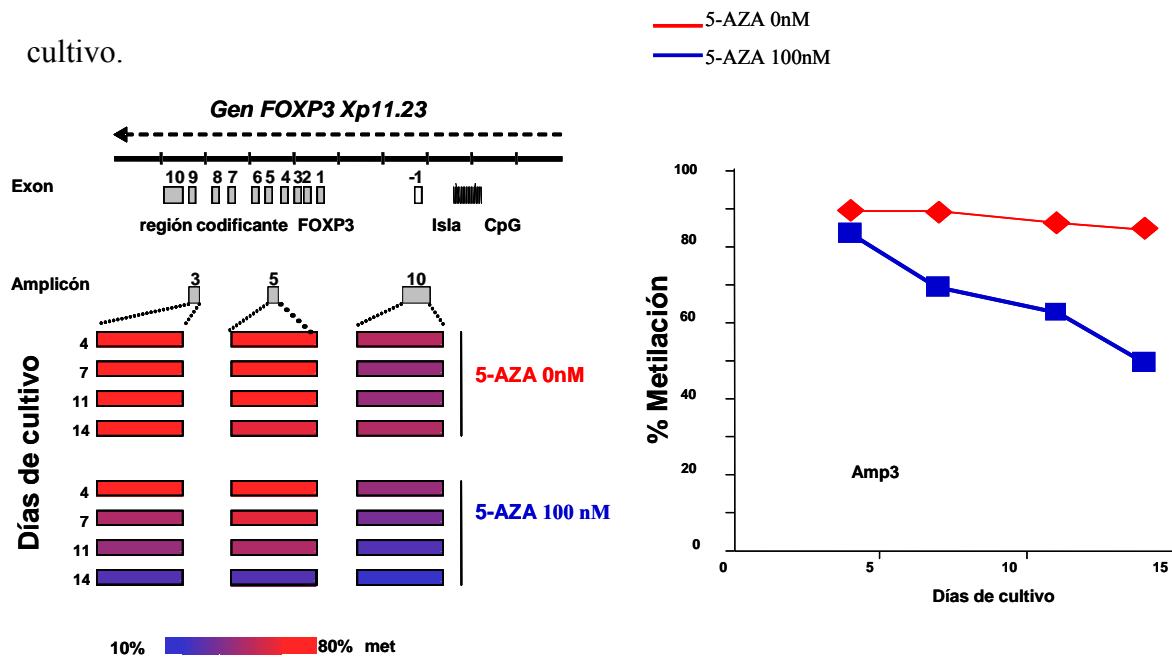


Figura 31: Representación del porcentaje de metilación del promotor de *FOXP3* en ausencia y presencia de 5-AZA 100nM a lo largo de los 14 días de cultivo.

En la figura 31 puede apreciarse como en los cultivos de LT estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 durante 14 días, la presencia de 5-AZA 100nM disminuyó la metilación del promotor de *FOXP3*, lo que justificaría la mayor expresión de *FOXP3* previamente descrita.

Por el contrario, en relación con los genes *TBET* o *GATA-3* el promotor se encuentra demetilado en situación basal, figuras 32 y 33, por lo que la 5-AZA no modifica el estado de metilación de estos promotores. Este hallazgo también está en consonancia con la ausencia de efecto del fármaco sobre la expresión de estos genes a lo largo del cultivo.

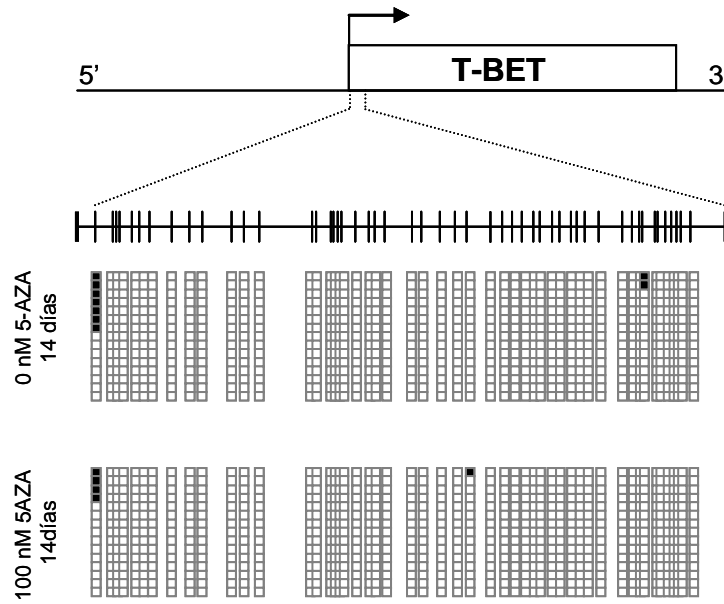


Figura 32: Representación del estatus de metilación del promotor de TBET de LT estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia y presencia de 5-AZA 100nM tras 14 días de cultivo.

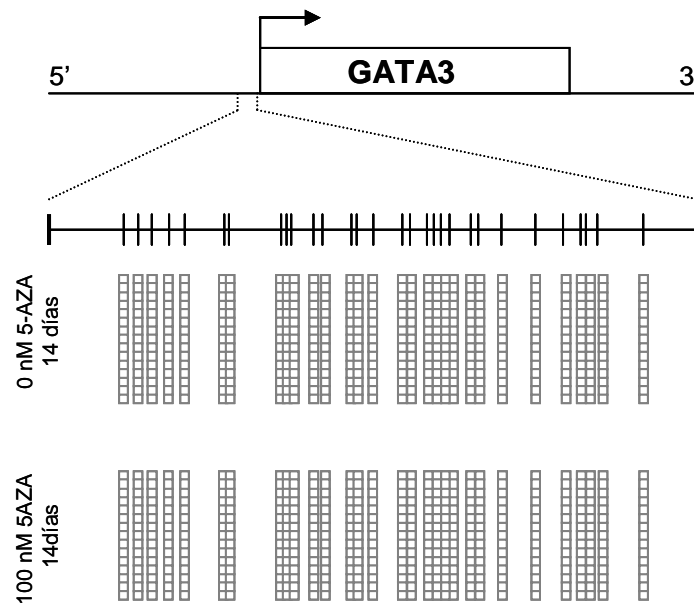


Figura 33: Representación del estatus de metilación del promotor de GATA3 de LT estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 en ausencia y presencia de 5-AZA 100nM tras 14 días de cultivo.

5.2. Estudio del efecto de 5-AZA sobre la expresión de AAT: *PRAME*.

5.2.1. Expresión de *PRAME* en blastos versus CD34⁺ de donantes sanos.

Se analizó la expresión de *PRAME* por RQ-PCR en blastos de pacientes de LMA, separados por citometría de flujo mediante el marcaje CD45/Anexina/7AAD/CD33 ó CD45/Anexina/7AAD/CD34 (según su fenotipo) y en células CD34⁺ aisladas de aféresis de donantes sanos mediante selección inmunomagnética.

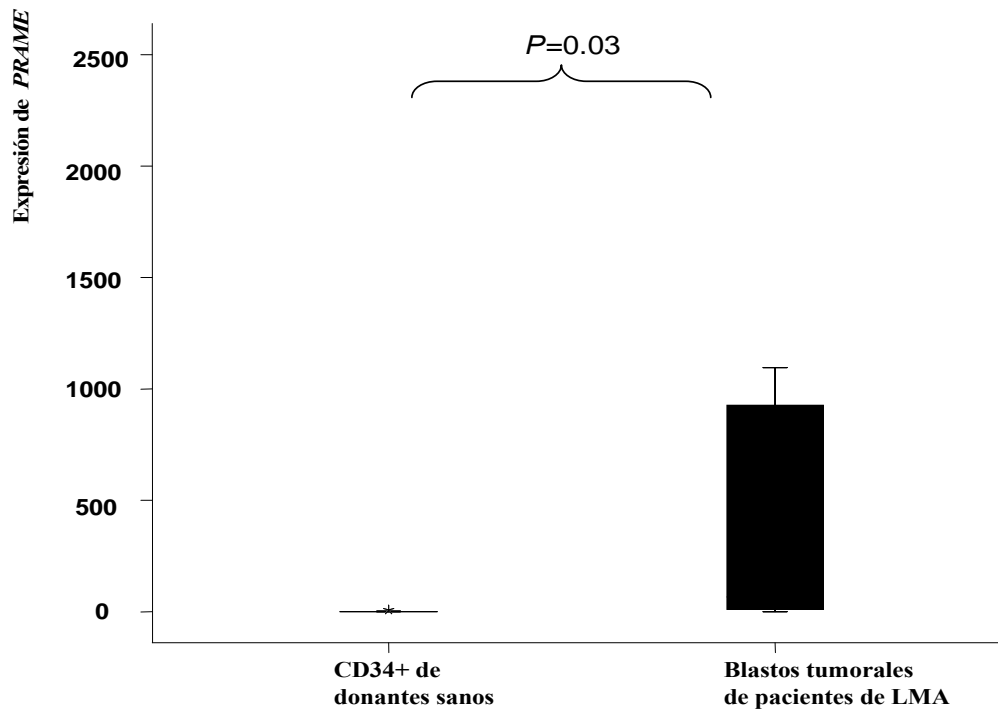


Figura 34: Representación estadística mediante box-plot de la expresión de *PRAME* en células CD34⁺ de donantes sanos versus blastos tumorales de pacientes de LMA.

En la figura 34 podemos ver como *PRAME* se sobreexpresa de forma estadísticamente significativa en la población tumoral en pacientes de LMA en comparación con las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ de donantes sanos.

5.2.2. Efecto de la 5-AZA sobre la expresión y metilación de *PRAME* en blastos y en CD34⁺ de donantes sanos.

Para evaluar el efecto de la 5-AZA sobre *PRAME*, se trataron las células CD34⁺ y los blastos durante 4 días con 5-AZA 1μM.

En la figura 35 observamos una mayor demetilación en las islas CpG del promotor de *PRAME* en las células tratadas con 5-AZA (mediana 21,6%, rango 5-37,8) con respecto a las células control sin tratar (mediana 34%, rango 5,6-44,5) aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Es interesante comprobar cómo en los pacientes con baja expresión de *PRAME* su promotor basalmente está muy metilado y, precisamente en estos casos, el tratamiento con 5-AZA aumenta la demetilación del promotor (27,2 versus 37,5%, p=0,068) especialmente en la isla CpG 13 (*) lo que se correlacionó con un incremento en la expresión de *PRAME*. Por el contrario, en las células CD34⁺ no se apreciaron diferencias entre la células tratadas y sin tratar con el fármaco (mediana 45 versus 43,5%).

En este sentido, entre los casos de LMA, todos aquellos que presentaban una expresión de *PRAME* inferior a la media incrementaban su expresión tras exposición al fármaco (salvo el caso 2 en el que este incremento no es significativo) mientras que en

aqueellos que presentaban una expresión basal alta no se aprecia tendencia significativa lo que se puede atribuir a que basalmente el promotor ya está demetilado.

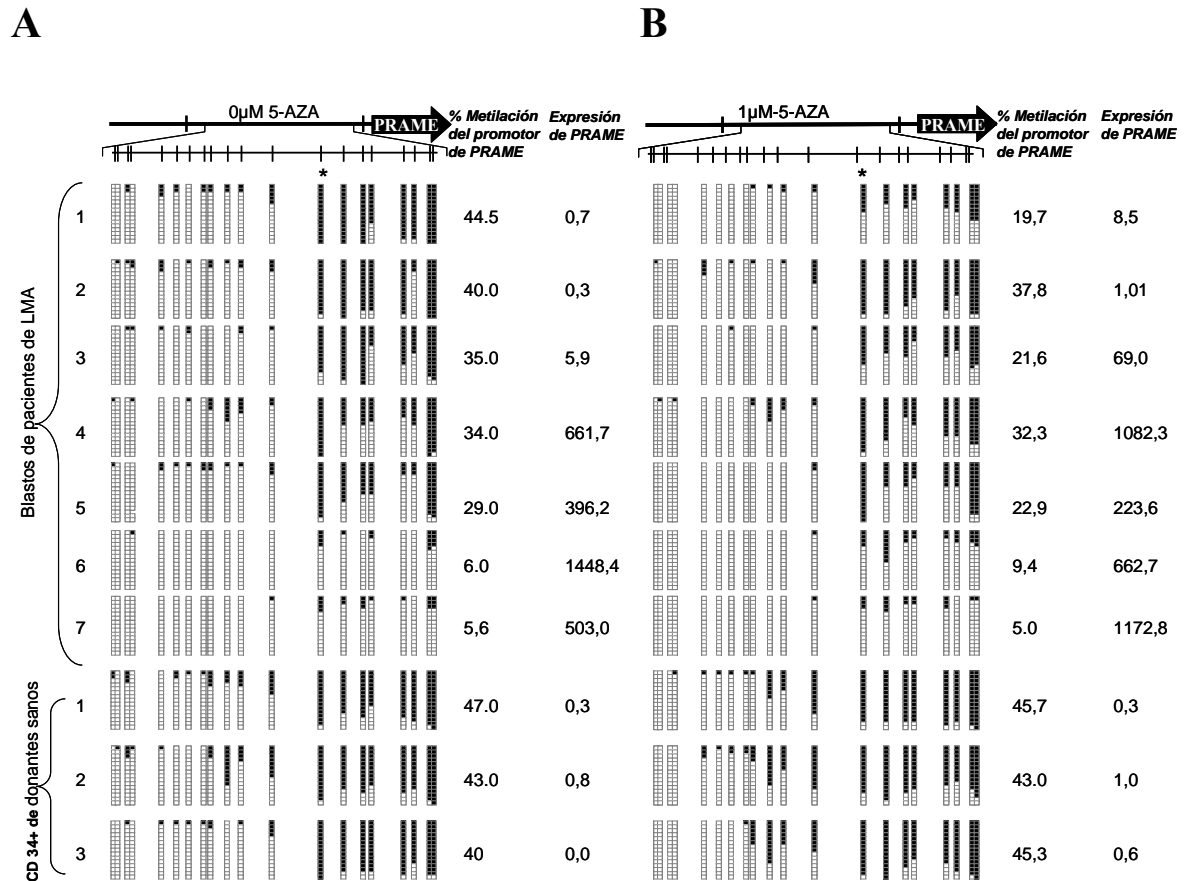


Figura 35: % de expresión y metilación del promotor de PRAME en blastos tumorales de 7 pacientes de LMA y en células CD34⁺ de 3 donantes sanos de médula ósea durante 4 días de cultivo en ausencia (A) y presencia de 5-AZA 1µM (B).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos analizado el efecto de la 5-azacitidina sobre los linfocitos T y algunos de los mecanismos que regulan la respuesta inmune, con el fin de evaluar su utilidad en el contexto del trasplante alogénico, tanto en la prevención/tratamiento de EICH como en la potenciación de EICL. Con respecto a la respuesta inmune, hemos comprobado que, *in vitro*, la 5-azacitidina disminuye la activación y proliferación de células T, bloquea el ciclo celular y aumenta la demetilación y expresión de *FOXP3*, lo que sugiere que podría ser un fármaco eficaz para inhibir la activación de las células T alorreactivas y favorecer la generación de una respuesta tolerogénica. En un modelo murino de trasplante de médula ósea, los ratones tratados con 5-AZA tienen una supervivencia mayor y desarrollan menor EICH. Por otra parte, hemos demostrado que la 5-AZA aumenta la expresión del antígeno asociado a tumor *PRAME* en blastos de pacientes con LMA, sin afectar a las células CD34⁺ de donantes sanos, lo que permitiría utilizar este antígeno como diana terapéutica para generar una respuesta inmune específica frente a células tumorales.

El presente es el primer trabajo²⁴ que evalúa el efecto de la 5-azacitidina sobre la activación de los linfocitos T. Estudios previos^{54,55} han descrito que la 5-AZA bloquea el ciclo celular en líneas tumorales a través de la activación de caspasas que finalmente inducen apoptosis⁵⁶. En este trabajo, hemos podido comprobar que la 5-AZA, en linfocitos T, controla el ciclo celular a dosis en las que no afecta la viabilidad linfocitaria. En cambio, la 5-AZA, por su acción como agente demetilante, modifica la expresión de genes que regulan el ciclo celular. Según Schmelz Karim *et al*⁵⁷, la 5-AZA induce la expresión de p21, deteniendo el ciclo celular en fase G₁, independientemente del estado de metilación de su promotor. Así mismo, estos autores comprueban que el fármaco restuara la expresión del gen supresor de tumores p73 en células tumorales de LMA en las que el promotor está hipermetilado. De este modo, se podría controlar el

ciclo celular de las células tumorales de pacientes con esta patología mediante el tratamiento con 5-AZA⁵⁷. Otros estudios llevados a cabo en células tumorales, han descrito la inducción del gen supresor de tumores p53 en respuesta al daño del ADN⁵⁸ causado por la 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA-dC). También se ha descrito que el tratamiento con 5-AZA-dC induce la expresión de p21 a través de un mecanismo p53 dependiente⁵⁸. Estudios similares han descrito cómo p53 puede inducir la expresión de genes como p21^{Waf1/Cip1}, GADD45 y Bax, que provocan la detención del ciclo celular. Sin embargo, la activación de p53 también puede ser regulada a través de otras modificaciones postranscripcionales, tales como fosforilación, acetilación y ubiquitinación, no solo por la demetilación del ADN⁵⁹.

De acuerdo con estudios previos realizados sobre células tumorales, en este trabajo demostramos que la presencia de 5-AZA 1μM en cultivos *in vitro* induce la expresión de genes implicados en el control y parada del ciclo celular en linfocitos T, como son p16, p27, p53 y p73. p27 se sobreexpresa a partir de las 12 horas de cultivo, mientras que p16, p53 y p73 lo hacen posteriormente²⁴.

Mientras que la 5-AZA²⁴ controla la proliferación y el ciclo celular tras unas horas de cultivo debido a la sobreexpresión temprana de p16, p27, p53 y p73 la regulación de la respuesta inmune en linfocitos T tiene lugar a tiempos más largos. En este sentido, hemos comprobado que, en presencia del fármaco, disminuye la activación linfocitaria, medida como la expresión de CD25 y CD40L, y la producción de IFN-γ y TNF-α. Curiosamente, varios autores⁶⁰ han demostrado que el promotor de IFN-γ se encuentra hipermetilado en linfocitos T. Sin embargo, en nuestra experiencia, tras el tratamiento con el agente demetilante 5-AZA, la expresión de IFN-γ no aumenta. Otros estudios,⁶¹ describen cómo el promotor de IFN-γ se regula fundamentalmente a través de acetilación y desacetilación de histonas, mientras que su expresión no se modifica de

manera significativa por agentes demetilantes del ADN. Los resultados obtenidos podrían explicarse por diversos mecanismos: así, el factor de transcripción *FOXP3* es una pieza clave en el desarrollo de linfocitos T reguladores mientras que la diferenciación hacia Th1, Th2 ó Th17 se produce merced a la sobreexpresión de los otros factores de transcripción. *TBET*, *GATA-3* y *ROR- γ* . Como hemos comprobado en los estudios de expresión mediante RQ-PCR *FOXP3* está sobreexpresado vemos en las muestras tratadas con 5-AZA, mientras que no se aprecian cambios en la expresión de *GATA-3*, *TBET* y *ROR- γ* . Estos hallazgos se explican mediante los estudios de metilación, que confirman que el promotor de *FOXP3* está metilado basalmente y se hipometila en presencia del fármaco, mientras que *TBET* y *ROR- γ* en situación basal ya están demetilados por lo que la 5-AZA no actúa sobre ellos. Estos resultados estarían en consonancia con estudios previos⁶²⁻⁶⁴ que afirman que modificaciones epigenéticas a nivel de histonas controlan la plasticidad celular de los linfocitos T CD4 *naive* hacia Th1, Th2 o Th17 y que además está asociado con la producción de diferentes citoquinas y factores de transcripción. En concreto, la sobre-expresión de *TBET* y *GATA-3* se relaciona con un aumento en la acetilación de la histona3 mientras que la diferenciación hacia Th17 (*ROR- γ*) únicamente se sabe que está regulada por la acetilación de histonas y la presencia de algunos factores de transcripción e interleuquinas como TGF- β , IL-6, IL-21 e IL-23⁶².

Por otra parte, los inhibidores de HDAC aumentan el número y función supresora de las células T reguladoras a través de la acetilación de histonas que conducirían al aumento de la expresión de *FOXP3*^{17,65}. Como queda reflejado en el presente estudio, éste no sería el único mecanismo epigenético que controlase la expresión de *FOXP3*, ya que hemos demostrado²⁴ cómo un agente demetilante del ADN, 5-AZA, demetila el promotor de *FOXP3* y aumenta la expresión de esta proteína.

De acuerdo con nuestros resultados, Stefan Floess *et al*²⁵ ha estudiado como la expresión de *FOXP3* está sujeta a modificaciones epigenéticas que controlan la diferenciación de los linfocitos T *naive* hacia el linaje regulador. Esto tiene grandes implicaciones terapéuticas en el contexto del trasplante hematopoyético y en la regulación de la respuesta inmune.

En este sentido, hemos utilizado 5-AZA en un modelo murino de EICH severo en el que comprobamos que la 5-AZA disminuye la mortalidad por EICH, alargando así, la supervivencia. Confirmando nuestros resultados, Jaebok Choi *et al*⁶⁶ han descrito recientemente que el uso de la 5-AZA postrasplante podría expandir células T reguladoras.

En el trasplante alogénico, tan importante como prevenir la EICH es mantener la respuesta inmune frente a las células tumorales, es decir, mantener el EICL. Para ello, nos hemos centrado en el estudio de una posible diana específica del efecto citotóxico de los linfocitos frente al tumor, como es *PRAME* y hemos analizado cómo la 5-AZA puede afectar a la expresión de este AAT en células tumorales sin afectar a las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺. Ikeda *et al*³⁷ ha descrito *PRAME* como un antígeno asociado a tumor que se expresa preferentemente en melanoma aunque también en algunas hemopatías malignas. Otros autores^{39,40}, han demostrado que genera una respuesta inmune específica LT CD8⁺ en pacientes de LMA, LMC y LLA por lo que *PRAME* podría ser una diana terapéutica muy interesante frente a las células tumorales y para el control de la enfermedad mínima residual⁶⁷. Algunos trabajos, han demostrado que *PRAME* se sobreexpresa en células tumorales de pacientes con leucemia pero no en médula ósea ni en sangre periférica de donantes sanos^{38,68}. Sin embargo, Steinbach *et al*⁶⁹ se ha visto como las células CD34⁺ de médula ósea también expresan *PRAME*. Esto supondría un problema en la utilización de este antígeno como

diana terapéutica en terapia antitumoral, dado que el efecto citotóxico anti-*PRAME* podría también afectar a los progenitores hematopoyéticos normales. Según nuestros resultados, *PRAME* se sobreexpresa significativamente más en blastos de pacientes de LMA que en células $CD34^+$ de donantes sanos, por lo que *PRAME* sí se podría utilizar como diana terapéutica para generar una respuesta inmune específica frente a las células tumorales.

Varios estudios han evaluado el efecto de 5-AZA sobre la expresión de *PRAME* en LMA aunque han empleado fundamentalmente líneas celulares^{44,45}. Ortmann *et al*⁷⁰ y Schenk *et al*⁷¹ han estudiado la expresión de *PRAME* en líneas celulares de LMA y demuestran que tras el tratamiento con 5-AZA la expresión de este antígeno aumenta. En otro estudio⁴³ se trataron líneas celulares de LMC y LLA con 5-AZA y todas ellas sobreexpresaron *PRAME* tras el tratamiento. Estos trabajos^{70,71}, también analizan la expresión de *PRAME* y el estado de metilación de su promotor, en pacientes con LMA. Sus resultados muestran que el promotor de *PRAME* está más demetilado en los pacientes que sobreexpresan *PRAME* con respecto a los pacientes que tienen baja expresión de *PRAME*. Finalmente, Roman-Gomez *et al*⁴³ ha demostrado que el promotor de *PRAME* estaba muy metilado en células de médula ósea y de sangre periférica de donantes sanos mientras que, en líneas celulares de LMC y en pacientes de LMC, *PRAME* estaba hipometilado.

En este trabajo hemos podido demostrar que la 5-AZA demetila el promotor de *PRAME* y aumenta su expresión en células tumorales de pacientes de LMA que inicialmente tienen baja expresión de *PRAME* porque su promotor está metilado. Sin embargo, aquellos pacientes cuyos blastos en el momento del diagnóstico, sobreexpresan *PRAME* tienen ya el promotor demetilado, y la 5-AZA no puede ejercer

su acción demetilante, por lo que en estos pacientes, no aumenta la expresión de *PRAME* tras el tratamiento con el fármaco. Además, hemos visto que la 5-AZA, no afecta a la expresión de *PRAME* en células CD34⁺ por lo que su uso postrasplante potenciaría la respuesta inmune específica CD8⁺ frente a células tumorales que sobreexpresen *PRAME*.

En definitiva, en el presente estudio hemos evaluado el efecto de la 5-AZA a nivel de los linfocitos T en los que favorece la expresión de *p27*, *p17*, *p53*, *p73*, *FOXO3a* y *FOXP3* y disminuye la expresión de IFN γ e IL-10, así como su posible utilidad postrasplante como profilaxis de EICH. Además, su efecto sobre la expresión de *PRAME* permitiría la sobreexpresión de este AAT de manera que sería posible la expansión posterior de linfocitos específicos anti-*PRAME*. De este modo disminuiría el riesgo de EICH y favorecería un EICL de manera específica.

7. CONCLUSIONES

1. En cuanto al efecto de la 5-azacitidina sobre el funcionamiento de los linfocitos T:
 - 1.1 La 5-AZA inhibe la proliferación linfocitaria, bloqueando el ciclo celular en fase G_0G_1 sin afectar la viabilidad linfocitaria a concentración $\leq 1000nM$.
 - 1.2 La 5-AZA disminuye la producción de citocinas proinflamatorias: $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$ e $IL-6$ y la expresión de marcadores de activación $CD40L$ y $CD25$.

2. En cuanto al mecanismo de acción de la 5-azacitidina se explica su efecto sobre los linfocitos T:
 - 2.1 Debido a su acción sobre genes que regulan el ciclo celular: $p16$, $p27$, $p53$ y $p73$
 - 2.2 Debido a su acción sobre genes que regulan la respuesta inmune: *TBET*, *GATA-3*, *ROR- γ* y *FOXP3*.

3. En relación a la utilidad de la 5-azacitidina en el contexto del trasplante alogénico:
 - 3.1 El modelo murino desarrollado indica que el tratamiento con 5-AZA disminuye la severidad de la EICH incrementando la supervivencia en un modelo murino de disparidad HLA.
 - 3.2 Este efecto podría deberse, al menos en parte, a la expansión de linfocitos T reguladores *in vivo*.

4. En cuanto a la expresión de *PRAME*:

4.1 *PRAME* está sobreexpresado en blastos de pacientes con LMA en comparación con las células CD34⁺ de donantes sanos. Esta sobreexpresión se debe a que el promotor de *PRAME* está más metilado en las células CD34⁺ que en las células tumorales.

4.2 La 5-azacitidina demetila el promotor de *PRAME* en blastos aumentando la expresión de este antígeno. Sin embargo, este fármaco no induce la sobreexpresión de *PRAME* en células sanas, por lo que se podría utilizar para generar una respuesta inmune específica frente a las células tumorales.

8. BIBLIOGRAFÍA

Reference List

- (1) Pavletic SZ, Khouri IF, Haagenson M et al. Unrelated donor marrow transplantation for B-cell chronic lymphocytic leukemia after using myeloablative conditioning: results from the Center for International Blood and Marrow Transplant research. *J Clin Oncol*. 2005;23:5788-5794.
- (2) Bensinger WI, Buckner CD, Anasetti C et al. Allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma: an analysis of risk factors on outcome. *Blood*. 1996;88:2787-2793.
- (3) Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca I, Diez-Campelo M, Caballero D, San Miguel J. Chronic graft-versus-host disease: Pathogenesis and clinical management. *Drugs*. 2006;66:1041-1057.
- (4) Perez-Simon JA, Martino R, Alegre A et al. Chronic but not acute graft-versus-host disease improves outcome in multiple myeloma patients after non-myeloablative allogeneic transplantation. *Br J Haematol*. 2003;121:104-108.
- (5) Martino R, Caballero MD, Perez-Simon JA et al. Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2002;100:2243-2245.
- (6) Bacigalupo A. Antithymocyte globulin for prevention of graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol*. 2005;12:457-462.
- (7) Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of graft-vs-host disease. En Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. 3rd. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, eds. Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation. Blackwell Publishing; 2004:353-368.
- (8) Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 1999;285:412-415.
- (9) Jun JE, Goodnow CC. Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nat Immunol*. 2003;4:1057-1064.
- (10) Appleman LJ, van Puijenbroek AA, Shu KM, Nadler LM, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates down-regulation of p27kip1 and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells. patent 6. 2002 Mar 2002.
- (11) José Igancio Neissa, Carlos Guerrero. Del código genético al código epigenético. Nuevas estrategias terapéuticas. 2004.

Ref Type: Report

- (12) Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1148-1159.
- (13) Wen H, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. *Blood.* 2008;111:1797-1804.
- (14) Jeremy M.Berg, John L.Tymoczko, Lubert Stryer. Lubert Stryer. *Bioquímica.* Lubert Stryer. 2008.
- (15) Griffiths EA, Gore SD. DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol.* 2008;45:23-30.
- (16) Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3:415-428.
- (17) Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med.* 2007;13:1299-1307.
- (18) Fitzpatrick DR, Wilson CB. Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clin Immunol.* 2003;109:37-45.
- (19) Regueiro González JR, López Larrea S, González Rodríguez E, Martínez Naves. *Inmunología biología y patología del sistema inmune.* Panamericana; 2004.
- (20) Novartis oncology. Deacetylase inhibitor in cancer: slide book compendium. 2008.
- (21) Thomas RM, Gao L, Wells AD. Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J Immunol.* 2005;174:4639-4646.
- (22) Avni O, Lee D, Macian F et al. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol.* 2002;3:643-651.
- (23) Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112:1557-1569.
- (24) Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaria C et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood.* 2010;115:107-121.
- (25) Floess S, Freyer J, Siewert C et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007;5:e38.
- (26) Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980;20:85-93.
- (27) Khong T, Sharkey J, Spencer A. The effect of azacitidine on interleukin-6 signaling and nuclear factor-kappaB activation and its in vitro and in vivo activity against multiple myeloma. *Haematologica.* 2008;93:860-869.

- (28) Gore S. Defining the role of epigenetic therapy in myelodysplastic syndromes. 2008.

Ref Type: Personal Communication

- (29) Muller A, Florek M. 5-Azacytidine/Azacitidine. *Recent Results Cancer Res.* 2010;184:159-170.
- (30) Celgene. Ficha técnica azacitidina. 2010.
- (31) Zorn E, Nelson EA, 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;108:1571-1579.
- (32) Rohner A, Langenkamp U, Siegler U, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leuk Res.* 2007;31:1393-1402.
- (33) Lal G, Zhang N, van der TW et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol.* 2009;182:259-273.
- (34) Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood.* 2009;114:3727-3735.
- (35) Yano S, Ghosh P, Kusaba H, Buchholz M, Longo DL. Effect of promoter methylation on the regulation of IFN-gamma gene during in vitro differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population. *J Immunol.* 2003;171:2510-2516.
- (36) Abul K Abbas, Andrew H Lichtman, Jordan S Pober. Inmunidad antitumoral. In: McGraw-Hill Interamericana, ed. *Inmunología celular y molecular.* 2002:398-418.
- (37) Ikeda H, Lethé B, Lehmann F et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity.* 1997;6:199-208.
- (38) van Baren N, Chambost H, Ferrant A et al. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br J Haematol.* 1998;102:1376-1379.
- (39) Griffioen M, Kessler JH, Borghi M et al. Detection and functional analysis of CD8+ T cells specific for PRAME: a target for T-cell therapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3130-3136.
- (40) Rezvani K, Yong AS, Tawab A et al. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2009;113:2245-2255.

- (41) Santamaria CM, Chillon MC, Garcia-Sanz R et al. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2009;114:148-152.
 - (42) Santamaria C, Chillon MC, Garcia-Sanz R et al. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. 2008;93:1797-1805.
 - (43) Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X et al. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2007;31:1521-1528.
 - (44) Epping MT, Bernards R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res*. 2006;66:10639-10642.
 - (45) Sigalotti L, Fratta E, Coral S et al. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*. 2004;64:9167-9171.
 - (46) Coral S, Sigalotti L, Altomonte M et al. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2690-2695.
 - (47) van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13:1901-1928.
 - (48) 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;25:402-408.
 - (49) Beillard E, Pallisgaard N, van dV, V et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17:2474-2486.
 - (50) Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc*. 2006;1:2353-2364.
 - (51) APID: Agile Protein Interaction Data Analyzer. *Nucl. Acids Res*. 34:W298-W302.PMID:16845013. 2006.
 - (52) APID2NET: unified interactome graphic analyzer. *Bioinformatics: Advance Access*. PMID: 17644818. 2007.
 - (53) www.cytoscape.org. <http://www.cytoscape.org> . 2010.
- Ref Type: Electronic Citation

- (54) Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980;20:85-93.
- (55) Jones PA, Taylor SM, Wilson V. DNA modification, differentiation, and transformation. *J Exp Zool*. 1983;228:287-295.
- (56) Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L et al. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:1718-1727.
- (57) Schmelz K, Wagner M, Dorken B, Tamm I. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces p21WAF expression by demethylation of p73 leading to p53-independent apoptosis in myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 2005;114:683-695.
- (58) Karpf AR, Moore BC, Ririe TO, Jones DA. Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol*. 2001;59:751-757.
- (59) Wang H, Zhao Y, Li L et al. An ATM- and Rad3-related (ATR) signaling pathway and a phosphorylation-acetylation cascade are involved in activation of p53/p21Waf1/Cip1 in response to 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *J Biol Chem*. 2008;283:2564-2574.
- (60) Gupta AK, Rusterholz C, Holzgreve W, Hahn S. Constant IFN γ mRNA to protein ratios in cord and adult blood T cells suggests regulation of IFN γ expression in cord blood T cells occurs at the transcriptional level. *Clin Exp Immunol*. 2005;140:282-288.
- (61) Morinobu A, Kanno Y, O'Shea JJ. Discrete roles for histone acetylation in human T helper 1 cell-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2004;279:40640-40646.
- (62) Mukasa R, Balasubramani A, Lee YK et al. Epigenetic Instability of Cytokine and Transcription Factor Gene Loci Underlies Plasticity of the T Helper 17 Cell Lineage. *Immunity*. 2010;32:616-627.
- (63) Chapoval S, Dasgupta P, Dorsey NJ, Keegan AD. Regulation of the T helper cell type 2 (Th2)/T regulatory cell (Treg) balance by IL-4 and STAT6. *J Leukoc Biol*. 2010.
- (64) Kemp KL, Levin SD, Bryce PJ, Stein PL. Lck mediates Th2 differentiation through effects on T-bet and GATA-3. *J Immunol*. 2010;184:4178-4184.
- (65) Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E et al. Histone deacetylase inhibitors and transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:589-595.
- (66) Choi J, Ritchey J, Prior JL et al. In vivo administration of hypomethylating agents mitigate graft-versus-host disease (GvHD) without sacrificing graft-versus-leukemia (GvL). *Blood*. 2010.

- (67) Matsushita M, Ikeda H, Kizaki M et al. Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia. *Br J Haematol.* 2001;112:916-926.
- (68) Greiner J, Ringhoffer M, Simikopinko O et al. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2000;28:1413-1422.
- (69) Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;133:118-123.
- (70) Ortmann CA, Eisele L, Nuckel H et al. Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2008;87:809-818.
- (71) Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46:796-804.

9. ANEXO

9.1. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting.

TRANSPLANTATION

Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting

Luis I. Sánchez-Abarca,¹ Silvia Gutierrez-Cosio,¹ Carlos Santamaría,¹ Teresa Caballero-Velazquez,² Belen Blanco,² Carmen Herrero-Sánchez,² Juan L. García,² Soraya Carrancio,² Pilar Hernández-Campo,¹ Francisco J. González,³ Teresa Flores,⁴ Laura Ciudad,⁵ Esteban Ballestar,⁵ Consuelo del Cañizo,^{1,2} Jesus F. San Miguel,^{1,2} and Jose A. Pérez-Simon^{1,2}

¹Hospital Clínico Universitario de Salamanca y Centro de Investigación del Cáncer (CIC/CSIC), Salamanca; ²Servicio de Hematología, CIC/CSIC, Salamanca; ³Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, OncoStem Pharma, Salamanca; ⁴Servicio de Anatomía Patológica, CIC/CSIC, Salamanca; and ⁵Chromatin and Disease Group, Cancer Epigenetics and Biology Programme (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain

Cytokine genes are targets of multiple epigenetic mechanisms in T lymphocytes. 5-azacytidine (5-azaC) is a nucleoside-based DNA methyltransferase inhibitor that induces demethylation and gene reactivation. In the current study, we analyzed the effect of 5-azaC in T-cell function and observed that 5-azaC inhibits T-cell proliferation and activation, blocking cell cycle in the G₀ to G₁ phase and decreasing the production of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α and interferon- γ . This effect was

not attributable to a proapoptotic effect of the drug but to the down-regulation of genes involved in T-cell cycle progression and activation such as *CCNG2*, *MTCP1*, *CD58*, and *ADK* and up-regulation of genes that induce cell-growth arrest, such as *DCUN1D2*, *U2AF2*, *GADD45B*, or *p53*. A longer exposure to the drug leads to demethylation of *FOXP3* promoter, overexpression of *FOXP3*, and expansion of regulatory T cells. Finally, the administration of 5-azaC after transplantation prevented the development of graft-versus-

host disease, leading to a significant increase in survival in a fully mismatched bone marrow transplantation mouse model. In conclusion, the current study shows the effect of 5-azaC in T lymphocytes and illustrates its role in the allogeneic transplantation setting as an immunomodulatory drug, describing new pathways that must be explored to prevent graft-versus-host disease. (*Blood*. 2010;115:107-121)

Introduction

The importance of epigenetic mechanisms in the fields of developmental and cancer biology is well established, and awareness in immunology is growing. Recent studies have been reported in which the authors identified gene methylation processes in immune phenomena such as T-lymphocyte lineage commitment, T-cell effector function, and memory. Cytokine genes in T lymphocytes are targets of multiple epigenetic mechanisms. Interleukin-2 (IL-2) was one of the first cytokine genes for which expression was shown to be enhanced by agents that inhibit DNA methylation.¹ In resting naive T cells, the IL-2 promoter DNA is methylated, and the locus is contained in inactive chromatin.^{2,3} Early after T-cell receptor stimulation and CD28 costimulation,^{4,5} one or both alleles become activated.⁴ Similar studies^{6,7} have been reported regarding interferon- γ (*IFN- γ*) gene methylation. Interestingly, epigenetic mechanisms such as DNA methylation also can play a role in the regulation of T-cell effector function. Accordingly, rapid demethylation of the *IFN- γ* promoter occurs only in memory cells which, in turn, can rapidly mount effector functions.⁸ Unlike IL-2, IL-4 expression occurs at a low frequency until reinforced by autocrine or paracrine signals through the IL-4 receptor and signal transducer and activator of transcription 6.^{9,10} When this occurs, activated expression of transcription factors such as GATA3 has a profound influence on the epigenetic state of the IL-4 locus.¹¹ These data

indicate that DNA methylation may be one mechanism through which T-cell cytokine gene expression is regulated and suggest a role of epigenetic mechanisms during Th1/Th2 differentiation or polarization.¹²⁻¹⁸

Regulatory T cells play a pivotal role in the maintenance of self-tolerance.^{19,20} Increasing evidence exists for a critical role of epigenetic modifications in the locus coding for the forkhead transcription factor *FOXP3*,²¹ which acts as a master switch controlling regulatory T-cell development and function²²; an evolutionarily conserved region within the noncoding part of the gene contains CpG motifs, which are completely demethylated in naturally occurring regulatory T cells but methylated in naive and effector T cells.

The currently available nucleoside-based DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor 5-azacytidine (5-azaC) is an analog of cytosine that is metabolically activated in vivo and readily incorporated into DNA during replication.²³⁻²⁵ As a result of the chemistry of the methyltransferase reaction, the DNMT becomes covalently linked to DNA, creating genome-wide protein-DNA cross-links.^{24,26} This action results in depletion of soluble DNMT protein levels, leading to replication-dependent global demethylation and gene reactivation.^{27,28} Therefore, 5-azaC has been approved by Food and Drug Administration for the treatment of myelodysplastic syndrome and other leukemias.²⁹

Submitted March 11, 2009; accepted September 28, 2009. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, November 3, 2009; DOI 10.1182/blood-2009-03-210393.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

Despite the importance of epigenetic regulation of the immune response, scant information is available concerning the effect of 5-azaC in this field, and only the effect of the drug on natural killer cells has been reported. In this regard, *in vitro* treatment of natural killer cells with 5-aza-2-deoxycytidine restores the IL-2 signaling pathway, leading to *FOXP3* expression.³⁰ In addition, 5-aza-2-deoxycytidine induces *KIR* DNA hypomethylation and heterogeneous expression of multiple *KIR* genes.³¹ In the current study we analyzed the effect of 5-azaC on T cells and its implications in the transplantation setting.

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. 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 were killed by cervical dislocation, and bone marrow (BM) and spleen from C57BL/6 mice were harvested by the use of standard techniques. Spleen-cell preparations were prepared by gently crushing the tissues to release the cells. Preparations were filtered to remove debris and washed twice in phosphate-buffered saline 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 2 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 5-azaC in RPMI at different doses and time intervals from day 0 to day 6 and from day 15 to 25. Finally, the best results were observed at a dose of 1 mg/kg administered intravenously at 60 and 84 hours after infusion, and experiments were repeated 4 times with 5 mice per group by the use of this specific approach. In addition, 3 groups of 5 mice also received 5-azaC on days 19, 21, and 23 after infusion. Mice were monitored and weighed twice a week. All moribund mice were humanely killed.

The degree of systemic GVHD was assessed by a standard scoring system that incorporates 5 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 also was assessed by detailed histopathologic analysis of skin, liver, and intestine.

Chimerism assays were performed in peripheral blood, spleen, and BM at 14 days after transplantation. For this purpose, 5×10^5 cells were stained by direct immunofluorescence by the use of monoclonal antibodies (MoAbs) conjugated with the following fluorochromes: fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), peridinin chlorophyll protein-Cyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5), and Alexa Fluor. Specific antibodies were purchased from BD Biosciences. The following combination was used: anti-H2D^b-FITC/anti-H2D^d-PE/anti-CD45-PerCP-Cy5.5/anti-CD34-AlexaFluor or anti-H2D^b-FITC/anti-H2D^d-PE/anti-CD45-PerCP-Cy5.5/anti-CD3-Alexa Fluor. Data acquisition was performed immediately after completion of sample preparation by the use of a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) equipped with CellQuest software (BD Biosciences).

Cell cultures

Peripheral-blood mononuclear cells from volunteer donors' buffy coats were isolated by density gradient centrifugation by the use of Ficoll-Paque solution and allowed to adhere to the tissue culture dish (BD Biosciences). After 2 hours at 37°C, nonadherent cells were collected, washed, and resuspended in culture medium that consisted of RPMI 1640 L-glutamine (2mM), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (10 mg/mL) plus 10%

human AB serum (Sigma-Aldrich). More than 90% of monocytes/macrophages were eliminated as monitored by flow cytometry (data not shown), and T cells were further purified by the use of anti-CD3 magnetic beads (Miltenyi Biotec) if required. Approval was obtained from the institutional review board for these studies, and informed consent for volunteer donors was provided in accordance with the Declaration of Helsinki.

Immunophenotypic analysis

A total of 5×10^5 nonadherent lymphocytes/well were seeded in 48-well plates and were 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 5-azaC (1nM, 10nM, 100nM, and 1 μ M) were added at day 0 and then every 24 hours during the 4 days of culture. Activation assays were performed on the second day of culture and viability and proliferation assays on the fourth day of culture. Cells were stained by use of the following 4-color combination of MoAbs: anti-CD25-FITC/anti-cytoplasmic IFN- γ -PE/anti-CD4-PerCP-Cy5.5/anti-CD40L-allophycocyanin, all purchased from BD Biosciences except anti-CD25-PE, which was provided by Immunotech. For intracellular cytokine staining, brefeldin A (10 μ g/mL) was added during the last 4 hours before acquisition. Simultaneous staining for intracytoplasmic IFN- γ and CD40L and surface antigens was performed by use of the IntraStain Fixation and Permeabilization kit (Dako Cytomation). Isotypic controls were used to analyze intracytoplasmic staining of IFN- γ and CD40L. Data acquisition was performed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) by use of the CellQuest software program (BD Biosciences) and analyzed with software Paint-A-Gate Pro (BD Biosciences) except for the analysis of intracellular IFN- γ , in which the CellQuest software was used.

To analyze the development of regulatory T cells after 4 days of *in vitro* culture, the following combination of MoAbs was used: CD25-FITC/CD127-PE/CD4-PerCP-Cy5.5/FOXP3-APC antibodies (all from BD Biosciences, except FOXP3, which was from eBiosciences). In brief, for surface staining, 100 μ L of sample per tube was incubated with the corresponding MoAbs for 15 minutes at room temperature in the dark. Cells were washed in phosphate-buffered saline and then fixed and permeabilized with FoxP3 Staining Buffer Set (eBioscience) for FOXP3 staining. In addition, *in vitro* expansion of T regulatory cells (Tregs) also was evaluated after 14 days of culture with plate-bound anti-CD3 (10 μ g/mL) and soluble anti-CD28 (1 μ g/mL) mAbs (BD Biosciences) plus IL-2 (R&D Systems) at 50 U/mL in the absence or presence of 5-azaC at 100nM with the same combination of MoAbs. Treg assessment also was performed in mice 3 to 4 weeks after transplantation by use of the Mouse Regulatory T-cell staining Kit (with APC FoxP3; eBioscience).

Cytokine assays

To measure the release of cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor- α , and IFN- γ), by stimulated T cells, we used the BD Human Th1/Th2 Cytokine CBA kit (BD Biosciences). The assays were performed according to the manufacturer's instruction on supernatant collected 4 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 was stained with the mixture of human cytokine capture bead suspension and the PE detection reagent. After 3 hours of incubation, samples were washed and then analyzed in a FACSCalibur (BD Biosciences) flow cytometer by use of BD CBA software. Human Th1/Th2 cytokine standards provided with the kit were appropriately diluted and used in parallel to samples for preparation of the standard curves.

Proliferation and apoptosis assessment

For the proliferation assays, 5×10^5 nonadherent lymphocytes, stained with PKH-67, were seeded in 48-well plates and cultured in medium alone or stimulated with either phytohemagglutinin A (5 μ g/mL) or plate-bound anti-CD3 (5 μ g/mL) plus soluble anti-CD28 (2.5 μ g/mL) MoAbs. 5-azaC at increasing doses from 1 to 1000nM was added to the culture as previously specified. After 4 days, cells were collected, stained with

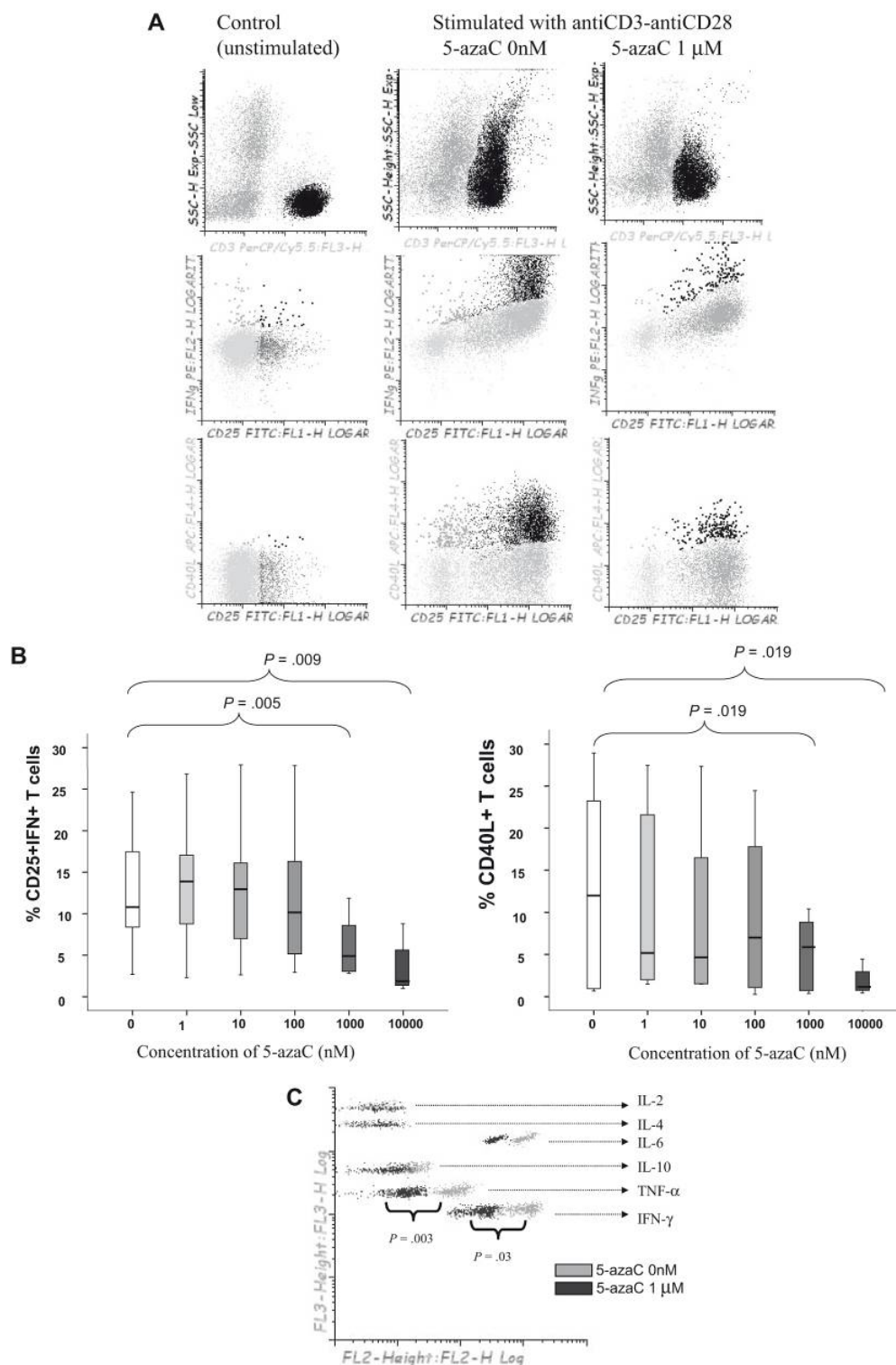


Figure 1. Effect of 5-azaC on the activation pattern of T cells. (A) Dot plot showing the forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) of resting versus anti-CD3 plus anti-CD28 stimulated T cells. The addition of 5-azaC significantly inhibited the activation of T cells as shown by a lower FSC/SSC among stimulated 5-azaC-treated T cells as well as a lower number of T cells expressing CD25 and intracellular IFN- γ and CD40L. A representative case of 9 experiments is shown. (B) Box-plot showing the dose-dependent effect of 5-azaC on the different activation parameters analyzed. (C) Supernatants CBA cytokine assays after 4 days of culture. A representative case of 5 cases analyzed is shown.

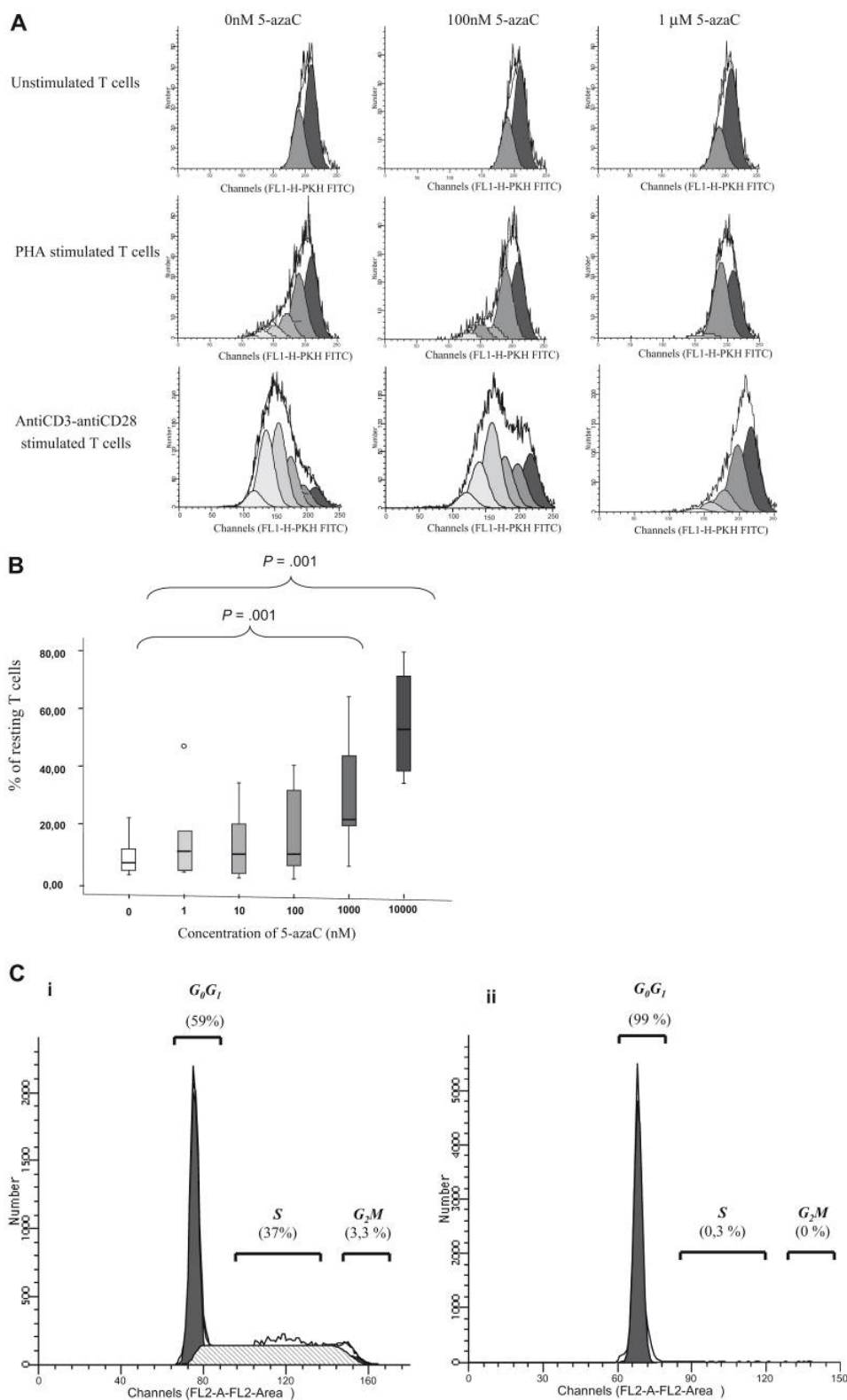
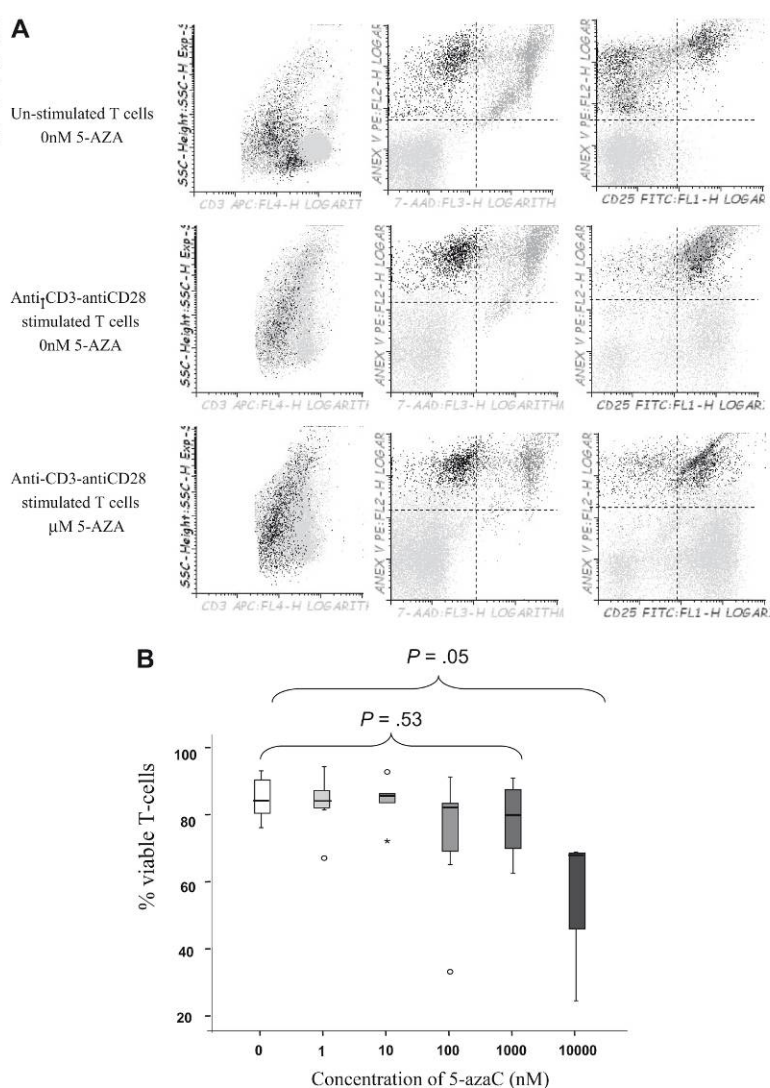


Figure 2. T-cell proliferation and cell-cycle analyses. (A) PKH staining showing the number of duplications of T cells under stimulation with either phytohemagglutinin A or anti-CD3 plus anti-CD28. A representative case of 8 cases is shown. (B) Box plot showing the dose response effect of 5-azaC on T-cell proliferation. (C) Cell-cycle analysis in stimulated T cells in the absence (i) or presence (ii) of 5-azaC at 1 μM ($P = .01$). A representative case of 8 cases is shown.

Figure 3. T-cell viability assays. (A) Dot plot showing T-cell viability as assessed by Annexin V and 7-AAD staining among unstimulated or stimulated T cells in the absence or the presence of 1 μ M of the drug. A representative experiment of 8 is shown. (B) Box plot representation showing the effect of 5-azaC on T-cell viability. Significant differences were only observed at a dose of 10 μ M of the drug.



CD25-PE, 7-amino-actinomycin (7-AAD), and anti-CD3-APC MoAbs and analyzed by flow cytometry. ModFit software was used to calculate the percentage of resting ($\text{PKH}^{\text{high}}\text{CD}25^{-}$) and proliferating cells.

Cell-cycle analysis also was performed after 4 days of culture. For this purpose 5×10^5 lymphocytes were stained with FITC-conjugated mAbs CD2, CD3, CD5, and CD7 (all purchased from BD Biosciences) and incubated for 15 minutes. Afterward, 500 μ L of solution B containing 0.5 g/L RNase (Sigma-Aldrich) was added and incubated for 10 minutes in the dark. Finally, 500 μ L of solution C containing 0.42 g/L propidium iodide (Sigma-Aldrich) was added to each tube, and cells were incubated in the dark for 15 minutes. After this period, measurements of the cell's DNA contents were performed in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). A minimum of 20 000 events were acquired. The distribution of cells along the cell-cycle phases was analyzed by use of the model included in the ModFit LT (Verity Software House) software program, after excluding cell debris and cell doublets.

For the detection of apoptosis, cell cultures were performed as previously described and the annexin V-PE/7-AAD apoptosis detection kit from BD PharMingen was used. In brief, a minimum of 5×10^5 T lymphocytes were washed and resuspended in Binding Buffer (1:10 diluted in H_2O)

while a cell concentration of $10^6/\text{mL}$ was maintained. Annexin V-PE and 7-AAD, 5 μ L each, were added and incubated for 15 minutes. To identify activated T lymphocytes, anti-CD25-FITC and anti-CD3-APC also were added. For every condition, 50 000 events were collected and analyzed. The percentage of annexin V-PE plus 7-AAD negative lymphocytes was calculated by the software Paint-A-Gate Pro (BD Biosciences).

DNA extraction, analysis of the gene promoter, bisulfite sequencing, and pyrosequencing

Genomic DNA was isolated by use of the DNA/RNA Micro Kit (Qiagen) following the protocol for animal and human cells. Bisulfite treatment of genomic DNA was performed with the Applied Biosystems methylSEQR Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems). Four regions from *FOXP3* promoter (Amp3, Amp5 [Treg-specific demethylated region], Amp 9, and Amp10) were amplified and sequenced according to Baron et al.³² Methylation status in the Treg-specific demethylated region was confirmed by quantitative polymerase chain reaction (PCR) following the protocol described by Wieczorek et al.³³ The CpG island DNA methylation status was determined by sequencing bisulfite-modified genomic DNA. For each

Table 1. Expression profile of genes related to immune response and T-cell proliferation among untreated versus treated T cells

Probe set ID	Gene symbol	Fold change		Gene description
		Untreated versus treated	Untreated versus treated	
		at 4 days	at 2 days	
8172631	<i>FOXP3</i>	3.41	1.89	Forkhead box P3
8038487	<i>IL4I1</i>	2.52	1.66	Interleukin 4–induced 1
8012257	<i>TP53</i>	2.19	2.15	Tumor protein p53
7931899	<i>IL15RA</i>	2.15	1.71	Interleukin 15 receptor, alpha
8035380	<i>IL12RB1</i>	2.01	1.49	Interleukin 12 receptor, beta 1
8129804	<i>MAP3K5</i>	–2.02	–1.50	Mitogen-activated protein kinase kinase 5
8119000	<i>MAPK14</i>	–2.74	–2.67	Mitogen-activated protein kinase 14
8068238	<i>IFNAR2</i>	–2.92	–3.11	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
7918902	<i>CD58</i>	–4.12	–5.56	Lymphocyte function-associated antigen 3
8176219	<i>MTCP1</i>	–4.38	–7.69	Mature T-cell proliferation 1

gene, primers were designed by use of the Methyl Primer Express Version 1.0 program (Applied Biosystems) corresponding to the region containing the oligonucleotide probe represented in the DNA methylation bead array. The following primers were used corresponding to 4 different amplicons of the *Foxp3* gene as described in Baron et al,³² including the promoter CpG island (Amp10, forward: GTAAAGGGTAGTTGGAAGGTAAA; reverse: AATTTACCTAATCCCCACATT), a conserved region after the transcription start site (Amp9, forward: GAGTTAATGGAGGTGGAGGTT; reverse: AAAAAAATAACCCCATCCCTA) and 2 sections of the coding region (Amp5, forward: GTGGGGTATTGTTTTTTTTTTT; reverse: AAAC-TAAAAATTCTCCCAAAC and Amp3, forward: TTTGGAAGGTGAGTTTTTTT; reverse: CTCTACCTCCCAATTTAAC). For quantitative purposes, cloning of each amplicon was performed, and sequencing of at least 15 clones was done.

RNA extraction, retrotranscription, and quantitative PCR

Total RNA was isolated by use of the DNA/RNA Micro Kit (Qiagen) following the protocol for animal and human cells. A total of 1 µg of RNA was retrotranscribed by use of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems). The quantification of the different genes was performed with the Step One Plus Real-Time PCR System and TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The assay IDs are included in supplemental Table 1 (available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Relative quantification was calculated by use of the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{ABLI}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Sample} - \Delta Ct_{Control}$ at 0 hours of incubation.³⁴ The Mann-Whitney nonparametric *U* test (SPSS 15.0 software) was used to compare different gene expressions between samples with or without 5-azaC at different time points.

Gene expression profile assays

Total RNA was extracted from cultures of sorted cells by use of TRIzol (Invitrogen) making a total of 12 samples (coming from time-series studies of 3 healthy individuals). The RNA integrity was confirmed with

Bioanalyzer 2100 by use of the RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies Inc). Three molecular biology kits (catalog nos. 3300, 2000, and 4200 from NuGEN Technologies Inc) were used to label the samples following the manufacturer protocol. Labeled samples were hybridized to Affymetrix Human Gene 1.0 ST arrays according to the manufacturer protocol (Affymetrix Inc).

A total of 7149 probesets of 33 297 in the Human Gene 1.0 ST array were filtered by the use of a customized method, built-upon SPOTFIRE 9.1 (TIBCO Software Inc) meeting 3 conditions. The selected probe sets have the following: (1) a ratio up to 0.25 between the standard deviation and the normalized signal average of 3 replicates at the end point of the study; (2) a fold change of 1.3 or more at the middle of the study versus initial time; and (3) a fold change of 1.1 or more at the end versus initial time. Differentially expressed genes were identified within these 7149 probes by use of SAM analysis. Data listing all genes that satisfied these criteria were analyzed by use of the Agile Protein Interaction DataAnalyzer (APID).³⁵ Those genes known to be involved in immune response at least 2 times (or 4 times for genes not related to T-cell activation) on treated versus nontreated samples were identified with APID2NET³⁶ on Cytoscape.³⁷ The whole signature of treated versus nontreated cells was calculated and represented through a hierarchical clustering analysis with SPOTFIRE 9.1 (TIBCO Software Inc) by the use of complete linkage as clustering method, Euclidean distance as similarity measure, and input rank as ordering function.

To analyze the DNA methylation profile *in vivo* in the mouse model, genomic DNA from mice was isolated and methylated DNA immunoprecipitation was performed as previously described.³⁸ In brief, denatured DNA fragments were immunoprecipitated by the use of a MoAb against 5-methylcytosine (Eurogentec). Subsequently the mixture was incubated with 30 µL of Dynabeads coated with M-280 sheep anti-mouse IgG antibody (DynaL Biotech) and washed 3 times. After recovering the pull-down methylated DNA by proteinase K digestion for 3 hours at 50°C, we purified the methylated DNA by phenol-chloroform extraction followed by ethanol precipitation. The pellet was dissolved in nuclease-free water (Ambion). Afterward genomic profiling was performed by the use of NimbleGen Arrays Hybridization Systems. Initial data preparation was performed with NimbleScan and SignalMAP software.

Table 2. Expression profile of genes not related to immune response with a fold change greater than 4 among untreated versus treated T cells after 4 days of culture

Probe set ID	Gene symbol	Fold change		Gene description
		Untreated versus treated	Untreated versus treated	
		at 4 days	at 2 days	
8000028	<i>DCUN1D3</i>	6.11	2.07	DCN1, defective in cullin neddylation 1
8031536	<i>U2AF2</i>	6.04	1.74	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2
8024485	<i>GADD45B</i>	5.95	3.30	Growth arrest and DNA-damage–inducible, beta
8087739	<i>CISH</i>	5.77	2.48	Cytokine inducible SH2-containing protein
8033392	<i>XAB2</i>	4.19	2.69	XPA binding protein 2
8024900	<i>UHRF1</i>	4.08	1.70	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1
7928471	<i>ADK</i>	–4.03	–2.92	Adenosine kinase
8095870	<i>CCNG2</i>	–4.72	–2.56	Cyclin G2

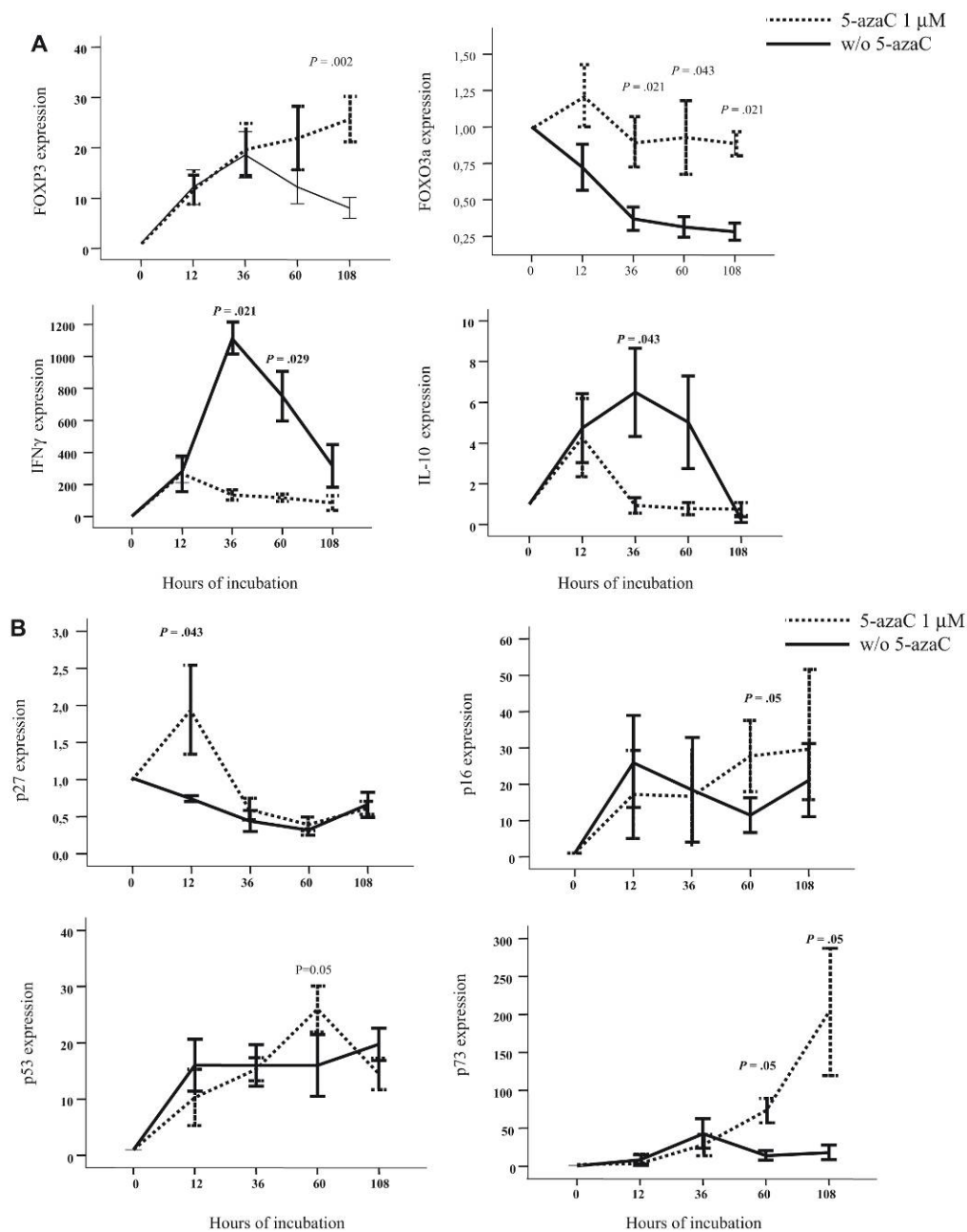


Figure 4. Effect of 5-azaC on the expression of genes involved in regulation of immune response and cell cycle. (A) RNA expression of FOXP3, FOXP3a, IFN- γ , and IL-10 as evaluated by quantitative PCR. Exposure to 5-azaC significantly increased the expression of FOXP3 and FOXP3a and decreased the expression of IFN- γ and IL-10 at different time-points during the T-cell culture. (B) RNA expression of p16, p27, p53, and p73; a significant increase in the expression of all these genes was observed at different time points after exposure to the drug (n = 4 cases analyzed).

Statistical analysis

Mean values and SD as well as the range and median were calculated for each variable by the use of the SPSS software program (SPSS 11.0). Comparison between groups was made by analysis of variance (post-hoc Scheffé and Tukey tests were performed to confirm differences between groups). A 2-way measure-

ment of repeated multiple analysis was performed to compare the effect of the different doses of the drug within the different types of culture and to evaluate the effect of the drug in the signs of GVHD at different time points. Kaplan-Meier product-limit estimates were used to evaluate the effect of the drug on survival. P values less than .05 were considered significant.

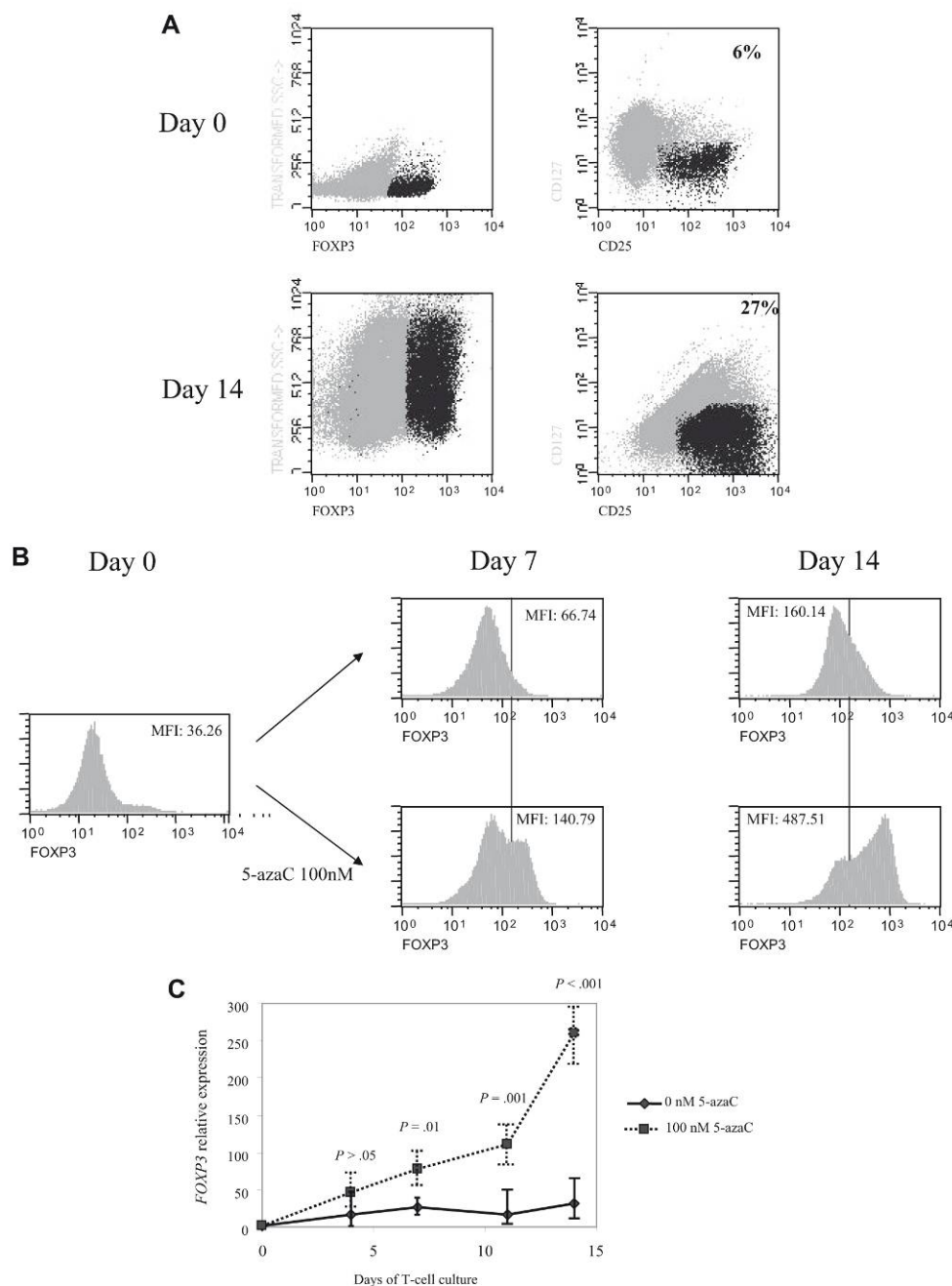


Figure 5. Effect of 5-azaC on the expression of FOXP3 and on the methylation pattern of FOXP3 promoter. (A) Regulatory T cells were identified as CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ CD127⁻ cells. A representative dot plot of 6 cases analyzed is shown. (B) Mean fluorescence intensity for FoxP3 at 0 and after 7 and 14 days of culture; a significant increase in the mean fluorescence intensity for FoxP3 was observed along the 14 days of culture in the presence of 5-azaC compared with controls; (C) quantitative PCR showed a significant increase in *FOXP3* expression in treated versus untreated T cells from day 7 to 14 of culture. (D) Effect of 5-azaC in the methylation status of the *FOXP3* gene. (i) Schematic overview of the *FOXP3* gene, including exons and position of its promoter CpG island. It is shown the position of the amplicons designed for methylation analysis. The bottom panel depicts a summary of the methylation levels measured by bisulfite sequencing of different samples indicated below. Each box represents 1 of the 4 amplicons studied with the average methylation rate according to the color code (scale is shown at the bottom: black indicates no methylation; gray, methylation). (ii) Graph corresponding to the change of methylation for one of the amplicons of the *Foxp3* gene at different time points (4, 7, 11, and 14 days) and presence or absence of 5-azaC (100 and 0nM). (iii) Individual bisulfite sequencing of the 4 selected regions of the *Foxp3* gene according to Baron et al.³² Fifteen clones are shown. Methylated and nonmethylated CpG sites are represented as black and white squares, respectively. Percentage of methylation is shown at the right hand side of each section. Eight samples are represented corresponding to 4 time points (4, 7, 11, and 14 days) in the presence or absence of 5-azaC (100 and 0nM).

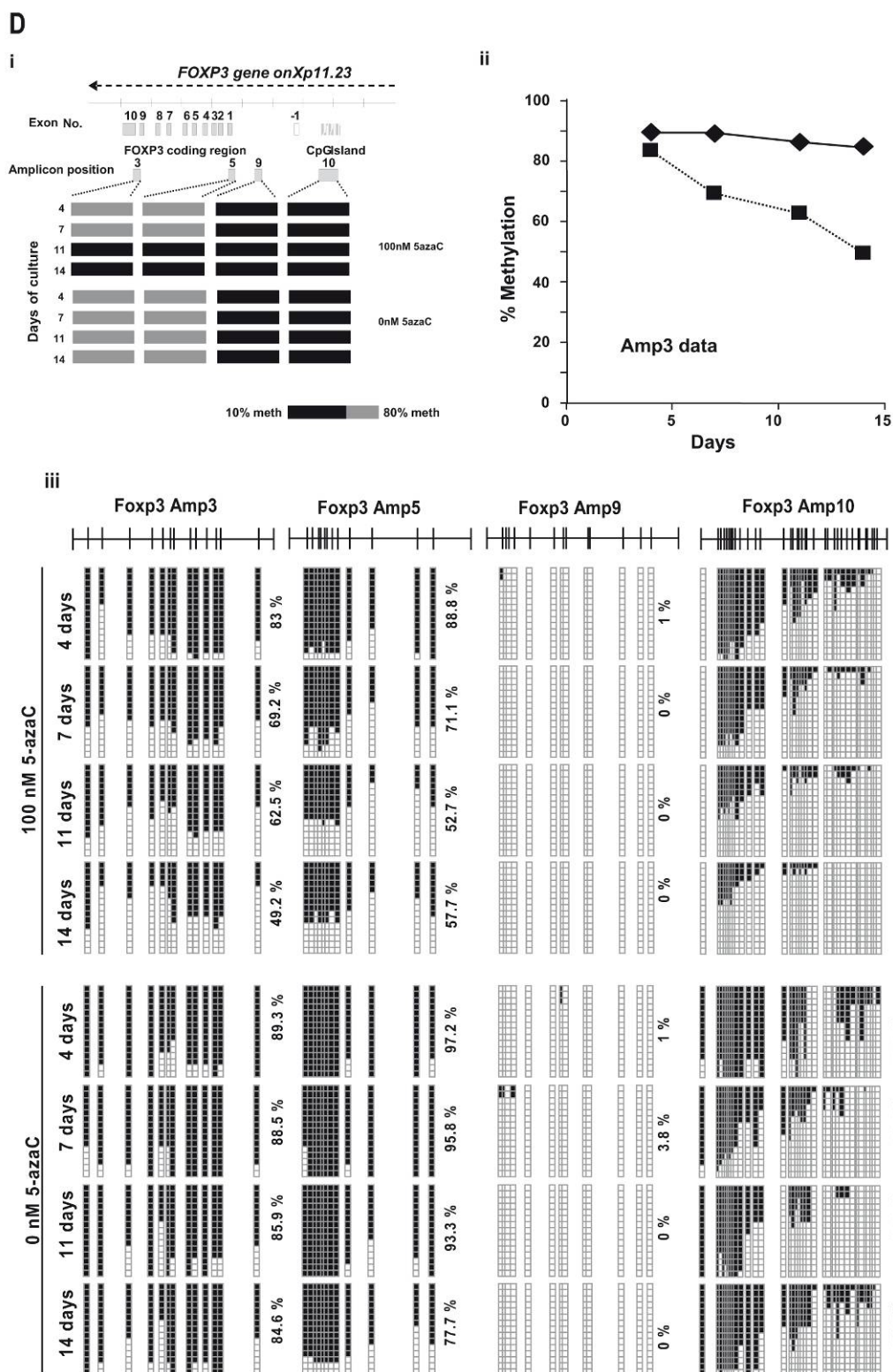


Figure 5. (continued)

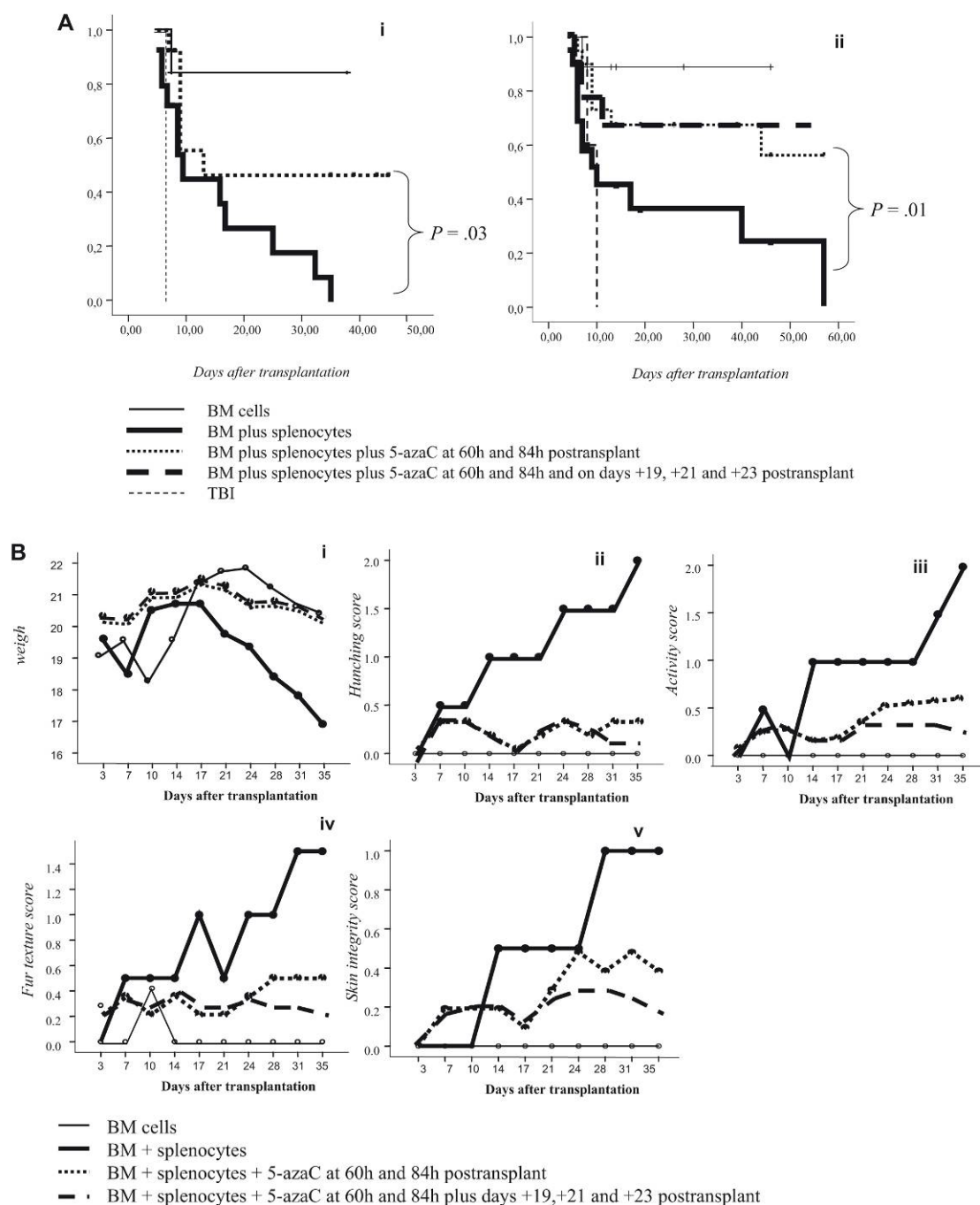


Figure 6. Survival and GVHD incidence among Balb-c mice receiving transplantation with or without 5-azaC. (A) Kaplan-Meier curves representing overall survival of mice after a dose of 10×10^6 splenocytes (i) or 5×10^6 splenocytes (ii). In both models the addition of the drug significantly improved survival. (B) Evolution of weight loss (i), hunching (ii), activity (iii), fur texture (iv), and skin integrity (v), along the period of observation. Statistically significant differences were observed for all parameters analyzed between the groups receiving splenocytes versus splenocytes plus 5-azaC ($P < .05$). (C) Dot plots demonstrating chimerism studies in transplanted mice; the percentage of CD45⁺ cells within the BM was similar among mice receiving (i) BM (mean percentage: 48%), (ii) BM plus splenocytes (44%), and (iii) BM plus splenocytes and 5-azaC (46%). In addition, the percentage of CD34⁺ cells within hematopoietic cells was not significantly different in BM upon comparing mice receiving BM (0.3%), BM plus splenocytes (0.22%), or BM plus splenocytes and 5-azaC (0.13%). Finally, the percentage of T cells (identified on the basis of their high expression of CD45, see supplemental Figure 3) among hematopoietic cells in BM was lower among mice receiving 5-azaC (0.8%) compared with those mice receiving BM plus splenocytes (1.68%) or BM cells (0.97%; $P = .05$ for the comparison between mice receiving splenocytes with or without 5-azaC); A representative case of 5 cases analyzed is shown.

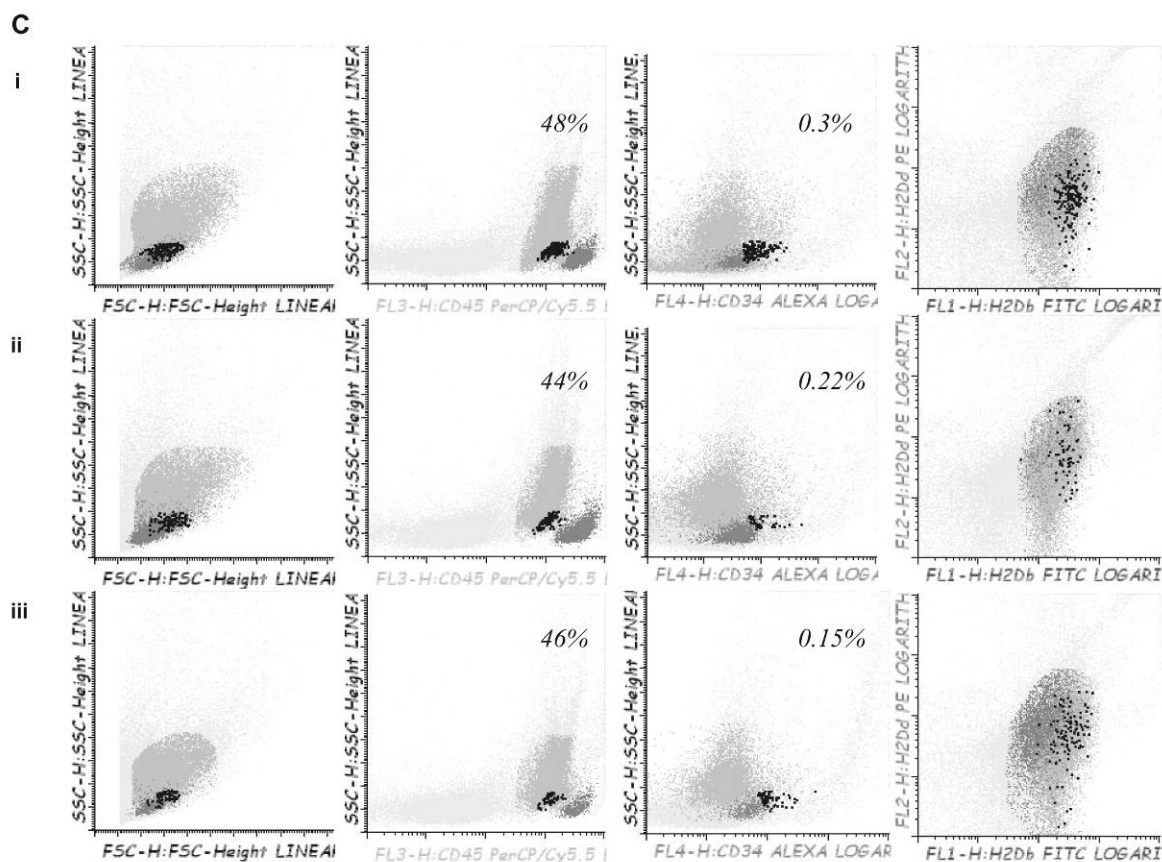


Figure 6. (continued)

Results

5-azaC inhibits T-cell activation and proliferation

First, we analyzed the effect of 5-azaC on the activation and proliferation of T cells. As shown in Figure 1A-B, the addition of 5-azaC to the cell culture significantly inhibited the activation of stimulated T cells in a dose-dependent manner. Moreover, supernatant cytokine assays confirmed that 5-azaC-treated T cells produced significantly lower amounts of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and IFN- γ compared with stimulated untreated T cells (Figure 1C).

We next evaluated the effect of the drug on T-cell proliferation. For this purpose, PKH staining was performed. As shown in Figure 2A-B, 5-azaC significantly inhibited the proliferation and, again, this effect was a dose-dependent one. For all these assays, a significant inhibition in both T-cell activation and proliferation was observed for doses 1 μ M or greater of the drug. To further assure the effect of the drug among activated T cells, cell-cycle analysis was performed in the absence or presence of 1 μ M of the drug by the use of propidium iodide assays, and, again, an inhibition of cell cycle was observed in the presence of the drug (Figure 2C).

This inhibitory effect of the drug could be attributable to an immunomodulatory effect or to a proapoptotic effect among activated T cells. To address this question we decided to perform viability assays in unstimulated versus stimulated treated or untreated T cells. As shown in Figure 3A and B, the drug affected

the viability of activated T cells at a dose of 10 μ M, whereas no significant effect on viability was observed at lower doses, thus indicating that at lower doses the drug induced an immunomodulatory effect.

Mechanisms involved on the effect of 5-AZA on T cells

To confirm the hypomethylating effect of 5-azaC on T cells we analyzed the DNMT1 (DNA methyltransferase) RNA levels and confirmed that, among 5-azaC-treated lymphocytes, DNMT1 expression decreased along the culture in the presence of the drug so that, after 4 days of exposure to 5-azaC, DNMT1 mRNA levels were 2.8 times (range, 1.8-3.5) lower compared with untreated T cells (supplemental Figure 1).

To elucidate the mechanisms involved in the effect of 5-azaC on T cells we performed gene expression assays in T cells untreated versus treated with 5-azaC at 1 μ M after 2 and 4 days of culture. The whole signature of 7149-filtered genes dysregulated in treated versus nontreated cells after 2 and 4 days of culture is represented in supplemental Figure 2A through hierarchical clustering analysis. SAM analysis of these 7149 probes revealed 2189 differentially expressed genes with a fold discovery rate of 0.63%. Among these, genes related to immune response were selected when a fold change greater than 2 times between treated versus untreated cells was observed after 4 days of culture. A fold change greater than 4 times was used to select genes not related to immune response. The array data discussed in this publication have been deposited in the Gene Expression Omnibus (National Center for Biotechnology Information) and are accessible through GEO Series accession

number GSE17922 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE17922>).

As shown in Tables 1 and 2, DNA damage–inducible genes such as *p53* or *GADD45B*, genes involved in the regulation of cell cycle such as *DCUN1D3*, and genes related to the regulation of the immune response such as *FOXP3* were up-regulated, whereas, on the contrary, genes related to progression of cell cycle such as *MAP3K5*, *MAPK14*, or to the synthesis of cytokines such as *IFNAR2* were down-regulated, explaining the effect previously described of the drug on T-cell proliferation and activation. In supplemental Figure 2B the partial gene regulatory network comprising those described on Tables 1 and 2 is shown.

To further confirm the effect of 5-azaC, RNA expression also was analyzed by the use of quantitative PCR. For this purpose, we focused on the analysis of genes related to immune response and T-cell proliferation. As shown in Figure 4A-B, we confirmed that T cells exposed to the drug up-regulated *FOXP3* and *FOXO3a* as well as genes involved in cell-cycle inhibition such as *p27*, *p16*, *p53*, and *p73* whereas they down-regulated *IFN* and *IL-10* genes. Moreover, we evaluated by the use of flow cytometry the expression of *FOXP3* among resting or stimulated T cells either untreated or treated with 1 μ M of the drug, and although a trend toward a greater percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻ T cells was observed among stimulated T cells treated with 5-azaC, differences were not statistically significant after 4 days of culture.

Next, we decided to increase the time of exposure to lower concentrations of the drug so that further assays were performed on days 4, 7, 11, and 14 of T-cell culture in the presence or absence of 100nM of the drug. Interestingly, a significant increase in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻ cells was observed along the 14 days of culture in the presence of 5-azaC compared with control (mean, 6% on day 0 vs 27% CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127⁻ cells at day 14 of culture in presence of 100nM 5-azaC; Figure 5A). Thus, as shown in Figure 5B the expression of FoxP3 significantly increased along the culture in the presence of 5-azaC. Furthermore, *FOXP3* expression also was assessed by quantitative PCR and again a significant increase was observed along the culture in the presence of 5-azaC at 100nM compared with controls (Figure 5C).

Finally, the methylation status of the *FOXP3* promoter was analyzed. As shown in Figure 5D the effect of 5-azaC on the methylation pattern among the CpG regions analyzed within the promoter³² increased along the culture period, being scant after 4 days of exposure to the drug and highly significant afterward (Figure 5D).

In vivo studies

To confirm in vitro findings we developed a GVHD mouse model. For this purpose, 5-azaC was administered at different doses and time points after transplantation. A dose of 1 mg/kg, which correspond to a concentration of 5-azaC in the range of 100 to 500nM, displayed the best results in terms of survival and GVHD prophylaxis. Similarly, different days of administration were tested, and finally, the best results were obtained when the drug was administered at 60 and 84 hours after cells infusion. Two different doses of splenocytes were infused to evaluate the effect of the drug in a more or less severe GVHD model, and, as shown in Figure 6A, in both models the administration of 5-azaC improved the survival of the mice. Also in both models the administration of the drug significantly decreased GVHD-related signs, as shown in Figure 6B. To evaluate the effect of the drug on engraftment, chimerism studies were performed in treated versus untreated mice 14 to 21 days after transplantation, and as shown in Figure 6C, no significant differences were observed regarding donor hematopoi-

etic engraftment, except for a lower percentage of T cells in mice receiving 5-azaC. Similar results were found in peripheral blood and spleen (data not shown). To evaluate the effect of a prolonged exposure to the drug, as previously mentioned by the use of in vitro studies, further doses of 5-azaC were administered to the mice. Although administration later than 84 hours and before 19 days after transplantation had a deleterious effect on outcome (data not shown), the administration of additional doses of 5-azaC on days 19, 21, and 23 did not modify survival but decreased the GVHD scores (Figure 6A-B).

By using the methylated DNA immunoprecipitation technique, we compared the methylation profiles of splenocytes from mice treated or not with 5-azaC on day 25 after transplantation. A significantly different profile was observed with 2398 versus 4180 genes methylated in treated versus untreated mice, thus confirming the effect of the drug on the methylation pattern also in vivo.

Finally, to confirm whether or not the use of 5-azaC allowed to expand Tregs in vivo, we performed immunophenotypic assays in peripheral blood, spleen, and BM of mice 3 to 4 weeks after transplantation. Compared with control mice, mice treated with 5-azaC 60 and 84 hours after transplantation did not show a significant increase in the percentage of regulatory T cells (data not shown), whereas mice receiving additional doses of 5-azaC on days 19, 21, and 23 experienced a significant increase in the percentage of Tregs in BM (not shown), spleen, and peripheral blood (Figure 7).

Discussion

5-azaC is a DNA-hypomethylating agent with significant activity in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias.³⁹⁻⁴¹ It induces leukemic differentiation and increases the expression of several tumor-associated antigens that could favor the graft-versus-leukemia effect,^{42,43} as recently reported in a series of patients receiving 5-azaC after allogeneic transplantation.⁴⁴

Epigenetic regulation of the cytokine genes, such as IFN- γ , IL-2, or IL-4, is a key event in the initiation of immune response,⁶⁻¹⁴ and accordingly, 5-azaC may influence on gene expression in T lymphocytes. Recently, several groups have observed that epigenetic regulation is crucial for controlling the expression of the *FOXP3* locus. This locus contains CpG motifs, which are completely demethylated in regulatory T cells but methylated in naive and effector T cells.^{22,45-49} On the basis of this concept, we evaluated the effect of 5-azaC on T cells. We found that 5-azaC inhibited T-cell activation, proliferation, and secretion of proinflammatory cytokines at 2 to 4 days of culture. These effects are not caused by a proapoptotic effect of the drug because they were observed at concentrations that did not induce a significant increase in T-cell death but to a direct effect on immune response. Among the potential target genes for the drug, we observed an increased expression of *FOXP3* by both RNA arrays as well as quantitative PCR. Nevertheless, we did not observe a significant increase in regulatory T cells as assessed by flow cytometry both in vitro and in vivo at 4 days of culture. Moreover, when we analyzed those regions of the promoter of *FOXP3* that have been previously identified as being involved in the regulation of the transcription of the gene,^{32,49} the methylation pattern was not altered by the exposure to the drug during 4 days, suggesting that other mechanisms are involved in this early immunomodulatory effect of 5-azaC, whereas, in contrast, a longer exposure to the drug induced

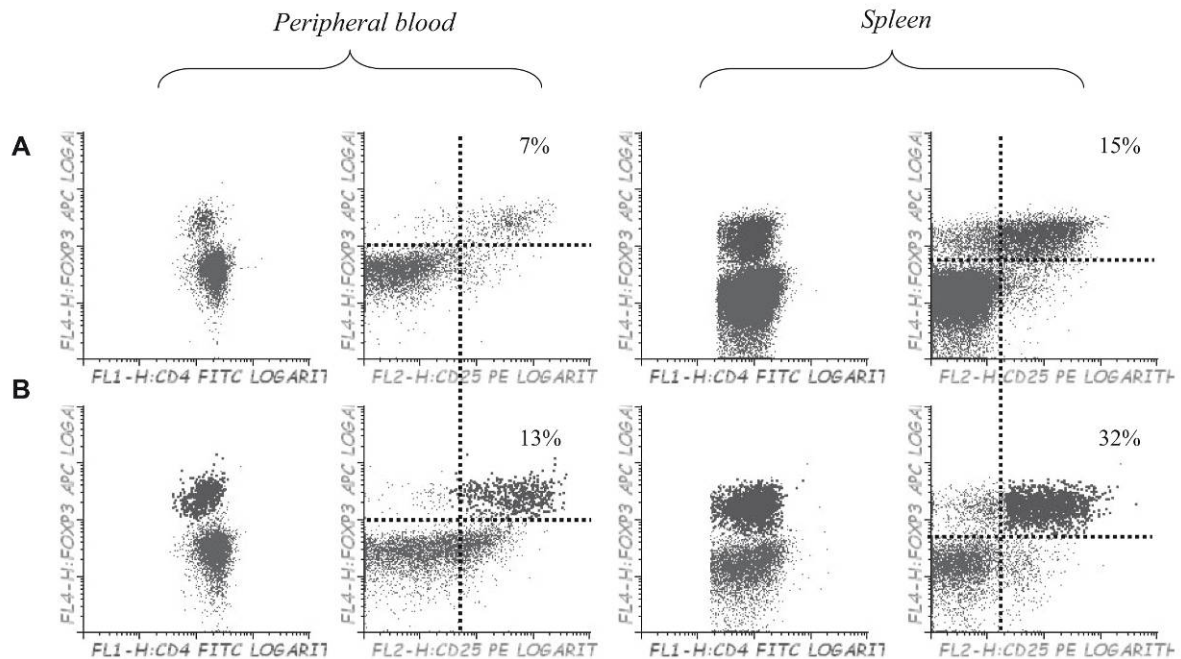


Figure 7. Effect of 5-azaC on the number of regulatory T cells in peripheral blood and spleen of mice after transplantation. Regulatory T cells in peripheral blood and spleen of (A) C57BL/6 mice and (B) Balb/c mice transplanted with C57BL/6 BM plus splenocytes and 5-azaC 60 and 84 hours after transplantation and on days 19, 21, and 23 after transplantation. Dot plot shows 1 representative case of 4 analyzed.

epigenetic modifications driving T-cell differentiation toward a regulatory phenotype.

Other drugs targeting epigenetic mechanisms have recently been used in the transplantation setting, such as the histone deacetylase inhibitor trichostatin-A,^{50,51} showing that histone deacetylase inhibitor promotes the generation and function of regulatory T cells. As for 5-azaC is concerned, in addition to *FOXP3*, which is induced after more than 4 days of exposure to the drug, other genes are most likely to explain the effect of 5-azaC on immune response in our model at the short term, such as *p16*, *p27*, *p53*, and *p73*, which are up-regulated early in T cells after exposure to the drug. More specifically, *p53* was identified by both RNA arrays and quantitative PCR. This gene has already been reported to be activated by 5-azaC in response to the DNA damage induced by the drug.^{52,53}

Interestingly, Schmelz et al⁵⁴ have reported that 5-azaC could induce *p21* expression by demethylation of *p73*, leading to *p53*-independent apoptosis in myeloid leukemia. Nevertheless, as previously mentioned, the effect of 5-azaC on immune response is observed at concentrations of the drug that do not induce apoptosis and, according to this data, other mechanisms not leading to apoptosis must also be involved. In this regard, as shown in Tables 1 and 2, several genes involved in T-cell proliferation and activation are down-regulated, such as *MAP3K5*,⁵⁵ *MAPK14*,⁵⁶ *IFNAR2*,⁵⁷ *CD58*,⁵⁸ *MTCP1*,⁵⁹ and *CCNG2*,⁶⁰ whereas other genes that may either induce cell-growth arrest, such as *DCUNID2*,⁶¹ *U2AF2*, *GADD45B*,⁶² *CISH*,⁶³ and *XAB2*,⁶⁴ or inhibit cell activation via nuclear factor- κ B inhibition, such as *FOXO3a*^{65,66} are up-regulated.

Interestingly, 5-azaC exerts its effect by sequestering the DNMT proteins. In the current study we observed a down-regulation of DNMT1 mRNA, which could be related to the activation of *p53* induced by the drug, as previously reported.⁶⁷

The early blockade of proliferation and activation, intimately linked in T cells, leads to the inhibition of GVHD in our mouse model. Not surprisingly, in this fully mismatched model, the most

effective time for the administration of the drug was in the range of 2 to 4 days after transplantation, which is the time where alloreactive T-cell expansion is maximal. By inhibiting this early expansion, the drug avoids the development of GVHD, which is of great interest in the allogeneic transplantation setting, especially considering the preliminary clinical data suggesting an antileukemic effect of the drug under this situation.⁴⁴ Most importantly, after a more delayed and prolonged exposure to the drug, the risk of GVHD was minimized, and this effect was associated to a Treg expansion that was demonstrated both in vitro and in vivo.

In conclusion, the current study shows the effect of 5-azaC in T lymphocytes, which is caused by both an early effect on the expression of genes related to T-cell proliferation and activation and a delayed effect on the methylation pattern of genes such as *FOXP3*. According to the present study 5-azaC may play a role in the allogeneic transplantation setting as an immunomodulatory drug.

Acknowledgments

We thank Enrique de Sena from the Department of Radiotherapy, and José María Martín from Discovery Information Systems at OncoStem Pharma for their technical support.

This work has been supported by a grant from the Junta de Castilla y León (ref GRS 196/A/08) and from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI080047).

Authorship

Contribution: L.I.S.-A. performed cell cultures; S.G.-C. performed in vitro functional assays; C.S. performed molecular assays; T.C.-V. and S.C. performed BMT in mouse models; B.B.

performed cell-cycle studies; C.H.-S. performed molecular assays; J.L.G. performed genomic DNA methylation assays in mice; P.H.-C. performed BCA assays; F.J.G. performed arrays assays; E.B. performed methylation studies; L.C. performed methylation assays; T.F. performed pathologic examination of mice samples; C.d.C. critically reviewed the manuscript and in vitro studies; J.F.S.-M. critically reviewed the research project;

and J.A.P.-S. developed experimental designs and the research project.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Jose A. Pérez-Simón, MD, PhD, Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente s/n, 37007, Salamanca, Spain; e-mail: pesimo@usal.es.

References

- Ballas ZK. The use of 5-azacytidine to establish constitutive interleukin 2 producing clones of the EL4 thymoma. *J Immunol*. 1984;133(1):7-9.
- Bruniquel D, Schwartz RH. Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat Immunol*. 2003;4(3):235-240.
- Ward SB, Hernandez-Hoyos G, Chen F, Waterman M, Reeves R, Rothenberg EV. Chromatin remodeling of the interleukin-2 gene: distinct alterations in the proximal versus distal enhancer regions. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(12):2923-2934.
- Holländer GA, Zuklys S, Morel C, et al. Monoallelic expression of the interleukin-2 locus. *Science*. 1998;279(5359):2118-2121.
- Rao S, Gerondakis S, Woltring D, Shannon MF. c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter. *J Immunol*. 2003;170(7):3724-3731.
- Fitzpatrick DR, Shirley KM, McDonald LE, Bielefeldt-Ohmman H, Kay GF, Kelsö A. Distinct methylation of the interferon gamma (IFN-gamma) and interleukin 3 (IL-3) genes in newly activated primary CD8⁺ T lymphocytes: regional IFN-gamma promoter demethylation and mRNA expression are heritable in CD44(high)CD8⁺ T cells. *J Exp Med*. 1998;188(1):103-117.
- Penix LA, Sweetser MT, Weaver WM, Hoeffler JP, Kerppola TK, Wilson CB. The proximal regulatory element of the interferon-gamma promoter mediates selective expression in T cells. *J Biol Chem*. 1996;271(50):31964-31972.
- Kersh E, Fitzpatrick D, Murali-Krishna K, et al. Rapid demethylation of the IFN- γ gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *J Immunol*. 2006;176(7):4083-4093.
- Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T-cell differentiation. *Immunity*. 1998;9(6):765-775.
- Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity*. 2001;14(3):205-215.
- Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:607-656.
- Penix LA, Sweetser MT, Weaver WM, Hoeffler JP, Kerppola TK, Wilson CB. The proximal regulatory element of the interferon- γ promoter mediates selective expression in T cells. *J Biol Chem*. 1996;271(50):31964-31972.
- Young HA, Ghosh P, Ye J, et al. Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN- γ gene. *J Immunol*. 1994;153(8):3603-3610.
- Bird JJ, Brown DR, Muller AC, et al. Helper T-cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*. 1998;9(2):229-237.
- Lee DU, Agarwal S, Rao A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity*. 2002;16(5):649-660.
- Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T-cell differentiation. *Immunity*. 1998;9(6):765-775.
- Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A. T_H-cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat Immunol*. 2002;3(7):643-651.
- Fields PE, Kim ST, Flavell RA. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN- γ loci accompany Th1/Th2 differentiation. *J Immunol*. 2002;169(2):647-650.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-562.
- Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005;6(4):331-337.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T-cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-1061.
- Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007;5(2):169-178.
- Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD, Robertson KD. DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol*. 2008;28(2):752-771.
- Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002;21(35):5483-5495.
- Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2006;66(5):2794-2800.
- Liu K, Wang YF, Cantemir C, Muller MT. Endogenous assays of DNA methyltransferases: evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol Cell Biol*. 2003;23(8):2709-2719.
- Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, et al. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell*. 2004;6(2):151-158.
- Weisenberger DJ, Velicescu M, Cheng JC, Gonzales FA, Liang G, Jones PA. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Mol Cancer Res*. 2004;2(1):62-72.
- Issa JP. Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndromes: dose, duration, and patient selection. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(1):S24-S29.
- 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(5):1571-1579.
- Chan HW, Kurago Z, Stewart CA, et al. DNA methylation maintains allele-specific *KIR* gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med*. 2003;197(2):245-255.
- Baron U, Floess S, Wiczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+)
- conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(9):2378-2389.
- Wiczorek G, Asemissen A, Model F, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res*. 2009;69(2):599-608.
- 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(4):402-408.
- APID: agile protein interaction DataAnalyzer. *Nucleic Acids Res*. 34(Web Server issue):W298-W302.
- Hernandez-Toro J, Prieto C, De las Rivas J. APID2NET: unified interactome graphic analyzer. *Bioinformatics*. 2007;23(18):2495-2497.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-2504.
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*. 2005;37(8):853-862.
- Silverman L, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002;20(10):2429-2440.
- Silverman L, McKenzie DR, Peterson BL, et al. Cancer and Leukemia Group B. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: studies 8421, 8921 and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol*. 2006;24(24):3895-3903.
- Sudan N, Rossetti JM, Shaddock RK, et al. Treatment of acute myelogenous leukemia with outpatient azacitidine. *Cancer*. 2006;107(8):1839-1843.
- Pinto A, Zagoni V. 5-Aza-2'-deoxycytidine (decabine) and 5-azacytidine in the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: past, present and future trends. *Leukemia*. 1993;7(1):51-60.
- Mompalmer RL, Bouchard J, Samson J. Induction of differentiation and inhibition of DNA methylation in HL60 myeloid leukemic cells by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Leukemia Res*. 1985;9(11):1361-1366.
- Jabbour E, Giral S, Kantarjian H, et al. Low-dose azacitidine after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Cancer*. 2009;115(9):1899-1905.
- Kim HP, Leonard WJ. CREB/ATF-dependent T-cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med*. 2007;204(7):1543-1551.
- Gupta S, Manicassamy S, Vash C, Kumar A, Shang W, Sun Z. Differential requirement of PKC-theta in the development and function of natural regulatory T cells. *Mol Immunol*. 2008;46(2):213-224.
- 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(11):1484-1492.
- 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(9):537-545.
49. Wilson B, Rowell E, Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(2):91-105.
50. Tao R, de Zoeten EF, Özkaynak E, et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med.* 2007;13(11):1299-1307.
51. Tao R, de Zoeten EF, Özkaynak E, et al. Histone deacetylase inhibitors and transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(5):589-595.
52. Zhu WG, Hileman T, Ke Y, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21 Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15161-15166.
53. Karpf AR, Moore BC, Ririe TO, Jones DA. Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol.* 2001;59(4):751-757.
54. Schmelz K, Wagner M, Dörken B, Tamm I. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces p21WAF expression by demethylation of p73 leading to p53-independent apoptosis in myeloid leukaemia. *Int J Cancer.* 2005;114(5):683-695.
55. Chen MC, Hwang MG, Chon YC, et al. The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in lymphotoxin-beta receptor-mediated cell death. *J Biol Chem.* 2003;278(18):16073-16081.
56. Wang M, Windgassen D, Papoutsakis ET. A global transcriptional view of apoptosis in human T-cell activation. *BMC Med Genomics.* 2008;23:1-53.
57. Uzé G, Schreiber G, Piehler J, Pellegini S. The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;316:71-95.
58. Wang JH, Smolyar A, Tan K, et al. Structure of a heterophilic adhesion complex between the human CD2 and CD58 (LFA-3) counterreceptors. *Cell.* 1999;97(6):791-803.
59. Stern MH, Soulier J, Rosenzweig M, et al. MTCP-1: a novel gene on the human chromosome Xq28 translocated to the T cell receptor alpha/delta locus in mature T-cell proliferations. *Oncogene.* 1993;8(9):2475-2483.
60. Bates S, Rowan S, Vousden KH. Characterisation of human cyclin G1 and G2: DNA damage inducible genes. *Oncogene.* 1996;13(5):1103-1109.
61. Ma T, Shi T, Huang J, et al. DCUN1D3, a novel UVC-responsive gene that is involved in cell cycle progression and cell growth. *Cancer Sci.* 2008;99(11):2128-2135.
62. De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, et al. Induction of gadd45-beta by NF-kappa-B downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature.* 2001;414(6861):308-313.
63. Nakajima Y, Tsuge I, Kondo Y, et al. Up-regulated cytokine-inducible SH2-containing protein expression in allergen-stimulated T cells from hen's egg-allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(9):1499-1506.
64. Nakatsu Y, Asahina H, Citterio E, et al. XAB2, a novel tetrapeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem.* 2000;275(45):34931-34937.
65. Lin L, Hron JD, Peng SL. Regulation of NF-kappa-B, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity.* 2004;21(2):203-213.
66. Coffey PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(11):889-899.
67. Schneider-Stock R, Diab-Assef M, Rohrbeck A, et al. 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(2):525-536.

9.2. Epigenetic regulation of *PRAME* in acute myeloid leukemia is different compared to CD34⁺ cells from healthy donors. effect of 5-aza treatment.

Title: Epigenetic regulation of *PRAME* in acute myeloid leukemia is different compared to CD34⁺ cells from healthy donors. Effect of 5-AZA treatment.

Authors:

Gutierrez-Cosio S, Santamaría C, de la Rica L, Ballestar E, Blanco B, Sánchez-Abarca LI, Herrero-Sánchez C, Caballero-Velazquez T, San Miguel JF, Pérez-Simon JA.

This work has been supported by a grant from the Junta de Castilla y León (ref GRS 196/A/08) and from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI080047)

Institutions:

Servicio de Hematología, Hospital Clínico Universitario de Salamanca y Centro de Investigación del Cáncer (CIC/CSIC), Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, Spain and Chromatin and Disease Group, Cancer Epigenetics and Biology Programme (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL).

Correspondence to:

Jose A Pérez-Simón, MD, PhD

Servicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca

Paseo de San Vicente s/n, 37007, Salamanca Spain

e.mail: pesimo@usal.es ; Phone: +34-923-291384

Running title: Epigenetic regulation of *PRAME*.***Introduction:***

Preferentially expressed antigen of melanoma (*PRAME*) was first isolated as a human melanoma antigen by cDNA expression cloning using melanoma-reactive cytotoxic T cells (CTL) (1;2). *PRAME* is a tumor associated antigen (TAA) of particular interest since it is widely expressed by lymphoid and myeloid malignancies (3;4) and solid tumors, including melanomas, sarcomas, head and neck cancers, small-cell lung carcinomas and renal cell cancers (1;2). In normal tissues, *PRAME* expression has been reported in testis and low levels are found in endometrium, ovaries and adrenals(1;2).

Regarding myeloid leukemias, it has been reported that *PRAME* is overexpressed in acute myeloid leukemia (AML) compared with blood and bone marrow from healthy donors (4-8). These studies have associated high *PRAME* RNA levels with good prognosis in some AML subtypes, especially those with favorable cytogenetics, ie, t(8;21) (7) or t(15;17) (5) and normal karyotype (8). In addition, several authors have suggested that *PRAME* could be used as a target for anticancer T-cell therapy (9;10). However, Steinbach et al. have shown that *PRAME* gene is also expressed, although at a lower intensity, in CD34⁺ stem cells from healthy donors, which might constitute a problem for its application as a target in tumor immunotherapy (11).

Epigenetic events represent the main mechanism regulating the expression of *PRAME* including DNA methylation of several promoter regions (12;13). In fact, a correlation between hypomethylated CpG dinucleotides in TAA promoters (i.e. *MAGE*, *GAGE* or *PRAME*) and their overexpression has been found in neoplastic cell lines and tissues (13-15) however, no information on both selected cells from patients with AML

and CD34⁺ cells from healthy donors are available. Inhibitors of DNA methylation, such as 5-azacytidine, (16;17) can reverse this epigenetic event suggesting a potential use in cancer therapy by inducing TAAs expression.

In the current study, we have compared the expression and methylation pattern of *PRAME* in blast cells from AML patients versus selected CD34⁺ stem cells from healthy donors. We found that the promoter region is highly methylated in normal CD34⁺ cells compared to blasts and this pattern correlates with higher expression of *PRAME* in blasts. Further, after treating cells with 5-azaC we observed that the level of *PRAME* methylation was reduced in AML patients which correlated with an increase in the expression of *PRAME*. By contrast, in CD34⁺ normal cells the effect of 5-azaC on the methylation pattern of the promoter of *PRAME* was significantly lower.

Patients and methods:

Patients and healthy stem cell donors:

Eight samples from healthy donors and eleven bone marrow samples from AML patients were obtained, after written consent of patients and donors.

Cell cultures:

CD34⁺ stem cells from healthy donors were isolated using the AutoMACS system (Miltenyi Biotec, bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. The purity of the stem cells was >95% as determined on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Bioscience).

Mononuclear cells from AML bone marrow samples were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient. Mononuclear cells were stained with a four-color combination of monoclonal antibodies (MoAbs) conjugated with the following fluorochromes: fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) and allophycocyanin (APC). Specific antibodies were purchased from Becton Dickinson Bioscience (BDB) Pharmingen (San Jose, CA). The following combinations were used: CD45FITC/AnexinaPE/7AAD/CD33APC or CD45FITC/AnexinaPE/7AAD/CD34APC, depending on blasts phenotype. After this procedure, leukemic cells were isolated with a flow cytometer, equipped with its accompanying software (FACSAria and FACSDiva, respectively, Becton Dickinson Biosciences).

The purity of the isolated cell populations was evaluated after acquiring blasts corresponding to each FACS-sorted cell fraction (FACSAria flow cytometer) and it was higher than >95% in all cases.

CD34⁺ stem cells and blasts were washed and cultured for four days under standard conditions in RPMI 1640 L-glutamine (2 mM), penicillin (100 UI/mL) and streptomycin (10 mg/mL) plus 10% human AB serum (Sigma). 1 μ M 5-azacytidine (Sigma) was added at day 1 and then every 24 hours during the four days of culture (16).

RNA extraction, retro-transcription and quantitative PCR

Total RNA was isolated using the DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA) following the protocol for animal and human cells. One μ g of RNA was retrotranscribed by using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems). The quantification of *PRAME* expression was performed using

the Step One Plus Real-Time PCR System and TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Relative quantification was calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ where $\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{ABLI}$ and $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Sample} - \Delta Ct_{Control}$ at 0 hrs of incubation (18).

Analysis of gene promoter methylation: Bisulfite sequencing

The CpG island DNA methylation status was determined by sequencing bisulfite-modified genomic DNA (Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer). Bisulfite modification of genomic DNA was carried out as described by Herman et al(19). For each gene, primers were designed using the Methyl Primer Express v1.0 program (Applied Biosystems) of the CpG island present at PRAME promoter. (Primers F: ATTTTTTTAGAGGGTTTGGGAG R: TTCCCAAACCTTTCTAAAACCC).

Statistical analysis:

Statistical analyses were performed using the SPSS software program (SPSS 15.0, Chicago IL). The Wilcoxon two-sample paired signed rank test was used to compare different gene expressions between 5-azaC treated or untreated samples at different time-points. P values less than 0.05 were considered significant.

Results and discussion:

PRAME expression and methylation status in AML blasts and CD34⁺ cells from healthy donors.

First, we compared *PRAME* mRNA expression of blast cells from 11 AML patients at diagnosis versus CD34⁺ stem cells from 8 healthy donors by RT-PCR. As shown in Figure 1, *PRAME* is significantly overexpressed in blasts compared with normal CD34⁺ cells (700±1102 vs. 1.8±2.5 p=0.002). While few studies have been reported analyzing *PRAME* expression in cell lines, the information using primary AML cells is scanty. On the other hand, Steinbach et al. (11) showed that *PRAME* is expressed by CD34⁺ stem cells, which might constitute a problem for the use of this antigen as a target in immunotherapy. By contrast, Greiner et al. (20) reported that CD34⁺ cells do not express *PRAME*. These inconsistent results could be explained since authors used different qualitative PCR protocols. In the current study we show that *PRAME* is overexpressed in leukemic cells as compared to CD34⁺ cells so that it could be used as a therapeutic target.

Next, in order to test whether the methylation status of *PRAME* is correlated with *PRAME* mRNA expression, we analyzed *PRAME* promoter from blast cells and CD34⁺ cells from healthy donors. We observed an inverse correlation between *PRAME* mRNA levels and methylation status as shown in figure 2A. Using a 500-fold the mean of *PRAME* expression in healthy donors as cut-off, patients with low *PRAME* gene expression levels (patients 1-4) showed a trend towards a higher percentage of methylated CpG (median 37.5%, range 29-44.5) as compared to cases with high *PRAME* expression (patients 5-7, median of methylated CpG 6.0% , range 5.6-34.0, p=0.08). Of note, we found a statistically significant association between *PRAME* expression and the degree of methylation in the promoter of *PRAME* among both AML samples and healthy donors ($r=-0.77$ p=0.010; Spearman correlation; Figure 3).

Interestingly, CpG 13 (marked with an asterisk in Figure 2A) showed a very good correlation between methylation status and *PRAME* gene expression levels. Thus,

we confirmed that there is a good correlation between *PRAME* methylation promoter, particularly CpG13, and *PRAME* expression. In this regard, Ortamann et al. (14) have previously reported a good correlation between *PRAME* intron1 hypomethylation status and *PRAME* overexpression in AML patients and Roman-Gomez et al. (13) have described an association between low methylation of *PRAME* exon2 and high gene expression. By contrast, there is only one study in which methylation status has been evaluated in the *PRAME* promoter region in 4 childhood AML samples, peripheral blood samples from healthy donors and K-562, U-937 and HL-60 cell lines (15). In the latter study it was observed that *PRAME* promoter is methylated in peripheral blood from healthy donors, in AML patients and in the cell line U-937 in which *PRAME* expression is negative, whereas this region is demethylated in high *PRAME* expressers cell lines (K-562 and HL-60) (15). However, the methylation status of the promoter region was not evaluated neither in selected blasts from AML patients nor in CD34⁺ cells from healthy donors. In the present study we show that *PRAME* promoter is demethylated specifically in the same CpG site as reported by Schenk et al. (15) in leukemic cells from *PRAME*-positive patients. Additionally, in leukemic cells from *PRAME*-negative patients and in CD34⁺ cells from healthy donors this region is methylated and *PRAME* expression is lower. This latter finding has not been previously reported and explains the lower expression of *PRAME* in normal cells compared to blasts and supports the use of *PRAME* as a therapeutic target in AML patients.

Treatment of blast cells from AML patients and selected CD34⁺ stem cells from healthy donors with 5-azaC.

To evaluate the effect of a hypomethylating agent (such as 5-azaC) on *PRAME* gene expression, we treated blast cells and CD34⁺ cells with 5-azaC. We observed a trend towards a reduction in methylated CpGs in cells treated with 5-azaC (percentage of methylation, median 21.6%, range 5-37.8) (Figure 2B) compared to non-treated control (percentage of methylation, median 34%, range 5.6-44.5, p=0.09) (Figure 2A). Interestingly, those cases with a lower expression of *PRAME*, i.e. those, with a higher percentage of methylation in *PRAME* promoter, showed the higher differences in methylation pattern prior to and after treatment with 5-azaC (27.2% vs 37.5%, p=0.068). By contrast, in healthy donor cells, no differences were observed between 5-azaC-treated and non-treated cells (median 45 vs. 43.5%, p=0.6). These results could suggest that the effect of 5-azaC could be leukemia-specific, which a higher effect on AML blasts in comparison to healthy cells. Thus, this study demonstrated for the first time that *PRAME* is overexpressed in primary leukemic cells but not in CD34⁺ normal cells after treatment with 5-azaC 1 μ M. Although further studies are needed to explain this selective effect, the induction of *PRAME* overexpression in leukemic cells without affecting CD34⁺ cells provides a potential selective target for immunotherapy.

In conclusion we show that 5-azaC induces overexpression of *PRAME* in blast cells from AML patients with no effect on CD34⁺ cells from healthy donors, suggesting that *PRAME* could be used as a target in tumor immunotherapy.

Figure Legends:

Figure 1: *PRAME* gene expression in CD34⁺ cells from healthy donors and in blast cells from AML patients.

Figure 2a: *PRAME* promoter methylation status in AML patients and in healthy donors.

Figure 2b: *PRAME* gene expression and methylation status in AML patients and healthy donors cells treated and non-treated with 1 μ M 5-azacytidine.

Figure 3: Correlation between *PRAME* methylation status and *PRAME* expression in AML patients and in healthy donors.

Reference List

- (1) Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997; 6(2):199-208.
- (2) Epping MT, Bernards R. A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res* 2006; 66(22):10639-10642.
- (3) van Baren N, Chambost H, Ferrant A, Michaux L, Ikeda H, Millard I et al. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br J Haematol* 1998; 102(5):1376-1379.
- (4) Paydas S, Tanriverdi K, Yavuz S, Disel U, Baslamisli F, Burgut R. PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects. *Am J Hematol* 2005; 79(4):257-261.
- (5) Santamaria C, Chillón MC, García-Sanz R, Balanzategui A, Sarasquete ME, Alcoceba M et al. The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 2008; 93(12):1797-1805.
- (6) Steinbach D, Schramm A, Eggert A, Onda M, Dawczynski K, Rump A et al. Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12(8):2434-2441.

- (7) Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A et al. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood* 2006; 108(13):4109-4117.
- (8) Santamaria CM, Chillon MC, Garcia-Sanz R, Perez C, Caballero MD, Ramos F et al. Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114(1):148-152.
- (9) Griffioen M, Kessler JH, Borghi M, van Soest RA, van der Minne CE, Nouta J et al. Detection and functional analysis of CD8+ T cells specific for PRAME: a target for T-cell therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12(10):3130-3136.
- (10) Rezvani K, Yong AS, Tawab A, Jafarpour B, Eniafe R, Mielke S et al. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113(10):2245-2255.
- (11) Steinbach D, Hermann J, Viehmann S, Zintl F, Gruhn B. Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 133(2):118-123.
- (12) Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(11):1148-1159.
- (13) Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Jose-Eneriz ES et al. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2007; 31(11):1521-1528.
- (14) Ortmann CA, Eisele L, Nuckel H, Klein-Hitpass L, Fuhrer A, Duhrsen U et al. Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2008; 87(10):809-818.
- (15) Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46(9):796-804.
- (16) Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaria C, Caballero-Velazquez T, Blanco B, Herrero-Sanchez C et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood* 2010; 115(1):107-121.
- (17) Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Tanzarella S, Danielli R, Colizzi F et al. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 2004; 64(24):9167-9171.
- (18) 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(4):402-408.

- (19) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(18):9821-9826.
- (20) Greiner J, Ringhoffer M, Simikopinko O, Szmaragowska A, Huebsch S, Maurer U et al. Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia. Exp Hematol 2000; 28(12):1413-1422.

Figure 1

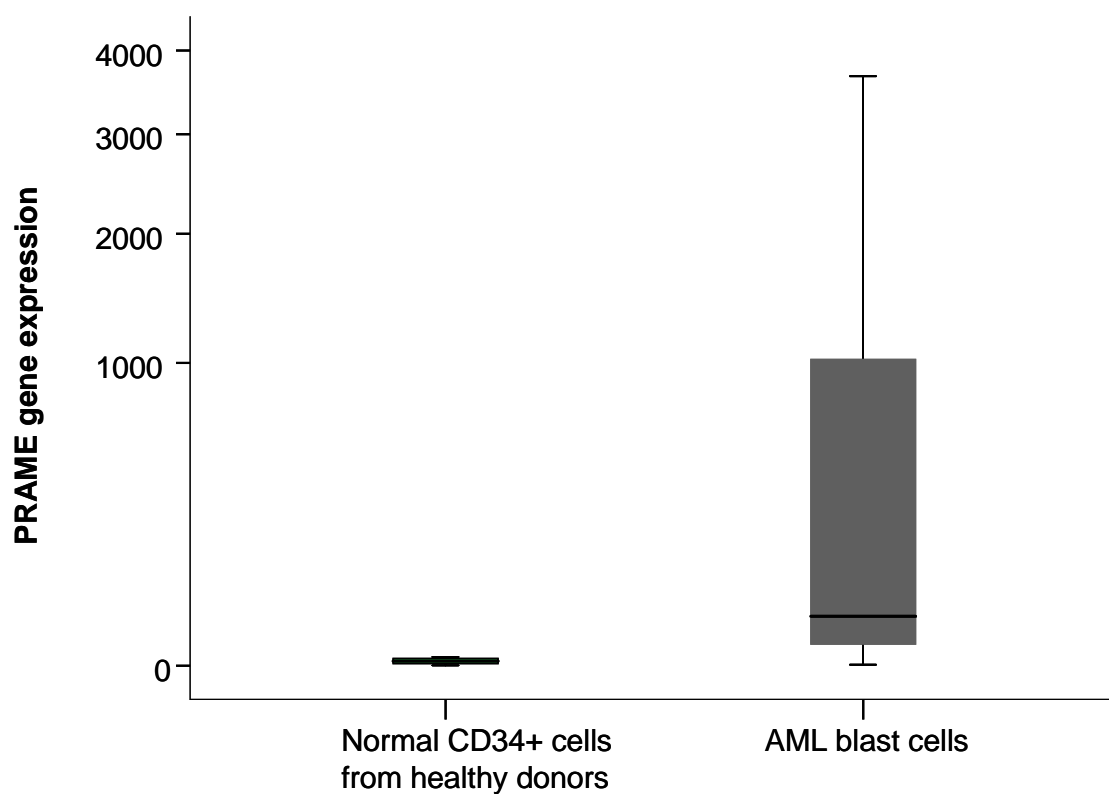


Figure 2

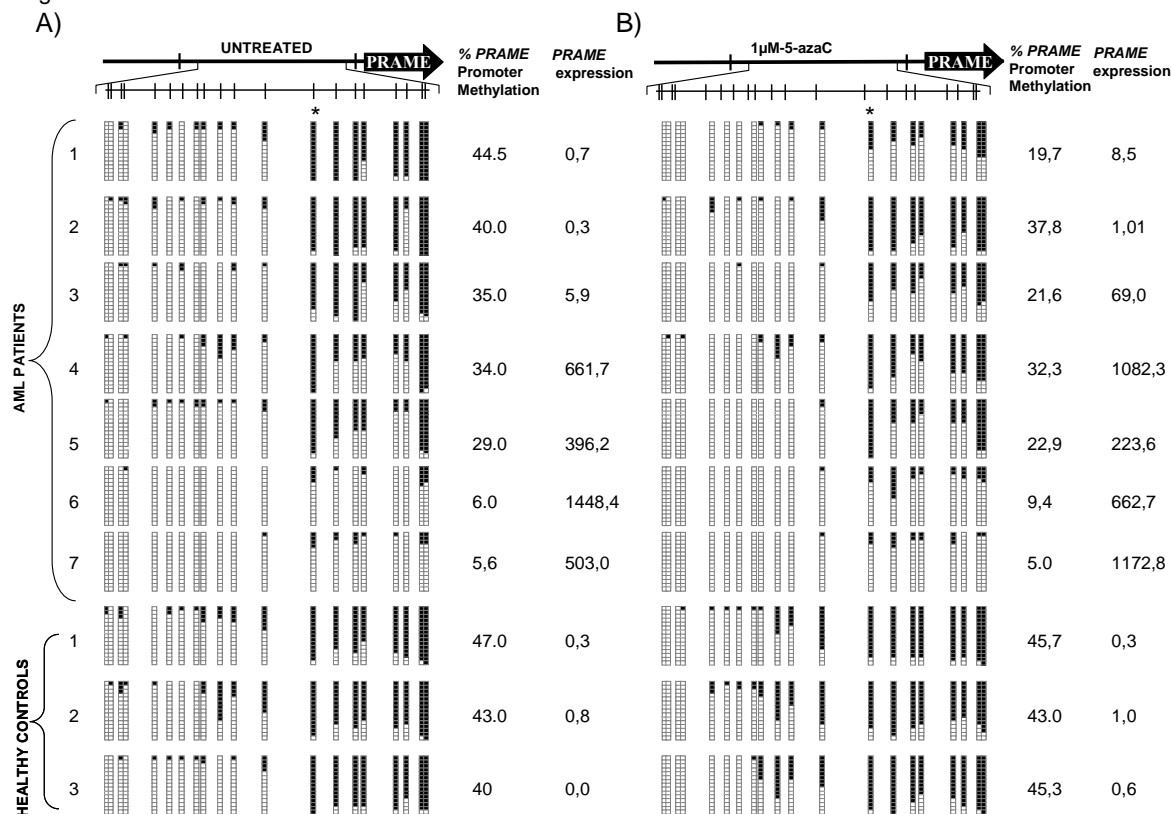


Figure 3

