

**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo A.C.**

**“EFECTO DEL TGF- $\beta$  EN LA ACTIVIDAD DEL  
PROMOTOR DEL GEN FOXP3 PORCINO EN  
CÉLULAS HEK293”**

POR:

**ANA ISABEL RAMÍREZ PADILLA**

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

HERMOSILLO SONORA

OCTUBRE DE 2011

## DECLARACIÓN

Se permiten y se agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD). Apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

Las publicaciones en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.

ATENTAMENTE



Dr. Ramón Pacheco Aguilar

## APROBACIÓN

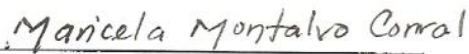
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Ana Isabel Ramírez Padilla, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dr. Jesús Hernández López

Director de Tesis



Dra. Maricela Montalvo Corral



Dra. Adriana Muhlia Almazan



---

Dra. Verónica Vallejo Ruiz

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Fondo Sectorial SALUD-CONACYT 127013.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a las instituciones que hicieron posible este trabajo al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C (CIAD A.C.) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme la oportunidad de ser becario.

También quisiera agradecer al Dr. Jesús Hernández por permitirme ser parte del Laboratorio de Inmunología, por ser un ejemplo a seguir, por sus enseñanzas, su paciencia, comprensión, por alentarme siempre a seguir adelante e ir más allá, por animarme a sacar lo mejor de mi y por su amistad.

Quiero agradecer a QB. Mónica Reséndiz Sandoval y a QB. Mónica Villegas Ochoa del CIAD, A.C. por el apoyo técnico prestado para el desarrollo de esta tesis.

Gracias a mi comité de tesis por su guía y dedicación a la evaluación de este trabajo, el cual estuvo integrado por la Dra. Maricela Montalvo Corral, la Dra. Adriana Muhlia Almazan y la Dra. Verónica Vallejo Ruiz del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR).

Quisiera agradecer a Argelia, Laurita, Vero y Héctor de la Coordinación de Docencia por su apoyo durante estos dos años, por tener buena disposición y una sonrisa siempre al recibirnos.

También quisiera agradecer a Fernando Leyva por su apoyo con el material electrónico que le solicitaba.

Gracias a mis amigos y compañeros de generación 2009-2011 por ser mis compañeros de aventura, por todos los momentos buenos y malos que

compartimos y por ser mi pequeña gran familia en Hermosillo, los quiero a todos.

También quisiera agradecer a mis compañeras de casa Karina y Vianey, por formar mi familia feliz, por ser más que mis amigas, mis hermanas. Por ser siempre un apoyo en las buenas, en las malas y en las peores. Por su compañía, consejos, risas, por consentirme con la comida (voy a extrañar esos hot cakes), por aprender italiano y portugués con ustedes y por todo lo demás que ustedes saben. De verdad que fue un gusto haber compartido todo este tiempo con ustedes, no lo cambiaría por nada, las quiero mucho!!!.

Gracias a mis amigos de laboratorio Mony, Mary, Alexel, Erika Silva, Erika Salcido, Lupita, Lilly, José Luis, Karina, Eli, Carlos, Lesly y Edgar por todos los momentos compartidos. Quiero dar un agradecimiento especial a Erika Silva, Mony y Alexel por sus consejos, dedicación, enseñanzas y disposición para compartir su experiencia y conocimientos. De igual forma quiero agradecer a Erika Salcido por ser mi amiga y compañera este último año de arduo trabajo. Por ser mi cómplice de travesuras, por las risas interminables, por tus ocurrencias, por ser paño de lágrimas y de enojos, entre muchas otras cosas. Te quiero Teresa!!!.

También quisiera agradecer a mis suegros Luis Parra y Leticia Ochoa, y a mis cuñados Martha, Mariana y Luis por el cariño que me han brindado todo este tiempo. Por apoyarme, cuidarme y estar siempre al pendiente de mi. Los quiero a todos!!!.

Finalmente, pero no menos importantes, quiero agradecer a mi padres Rosario Padilla y Juan de Dios Ramírez por ser un ejemplo en todo momento, por darme lo mejor de ustedes, por apoyarme en todas mis decisiones, por enseñarme que todo se puede lograr con esfuerzo y dedicación, por darme ánimos, consejos, regaños, etc. En fin, no pude haber

tenido mejores padres, los quiero mucho. A mi hermana Gaby por ser siempre una guía tanto en lo personal como en lo académico y por darme un sobrino hermoso. Te quiero mucho!!!.

## **DEDICATORIA**

Quisiera dedicar esta tesis a Oliver Parra por ser mi compañero de vida, porque gracias a tu amor, a tu apoyo incondicional y a que siempre me haces reír pude superar los momentos difíciles. A mi bebé, a pesar de que aún no te conozco, ya eres mi inspiración a seguir adelante y superarme. Espero ser un buen ejemplo para ti. Esto es para ustedes, los amo.



## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE TABLAS .....	XIV
RESUMEN .....	XV
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	3
Linfocitos T .....	3
Clasificación y función de linfocitos T cooperadores .....	3
Linfocitos T reguladores .....	4
Función de los Tregs .....	5
Clasificación y diferenciación .....	5
Mecanismos de supresión .....	8
Linfocitos T reguladores de cerdo .....	9
Foxp3.....	10
Vías de señalización que inducen la expresión de Foxp3.....	11
Estructura del gen <i>foxp3</i> .....	13
Foxp3 de cerdo .....	13
TGF- $\beta$ .....	14
Diferenciación de Tregs .....	15

Regulación de la transcripción de Foxp3 .....	16
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
General.....	19
Particulares.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Herramientas bioinformáticas .....	20
Extracción de ADN .....	20
Amplificación del promotor central del Foxp3 porcino .....	21
Purificación de productos amplificados y secuenciación .....	21
Clonación de la región promotora de <i>foxp3</i> de cerdo en el vector PCR 2.1-TOPO.....	22
Clonación de la región promotora de <i>foxp3</i> de cerdo en el vector pGL4.12.....	22
Cultivo celular .....	23
Transfección y estimulación de células HEK293 .....	23
Ensayo de actividad del promotor por luminiscencia.....	25
RESULTADOS.....	27
Localización del promotor del <i>foxp3</i> en el cromosoma X.....	27

Amplificación del promotor central del <i>foxp3</i> de cerdo .....	32
Clonación del producto amplificado .....	35
Transfección del vector pGL4.12-pFoxp3 y ensayos de activación del promotor por luminiscencia .....	39
DISCUSIÓN .....	41
CONCLUSIONES .....	45
REFERENCIAS .....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de nTregs e iTregs y los marcadores asociados .....	7
Figura 2. Vías de señalización que inducen la expresión de Foxp3 .....	12
Figura 3. Esquema del gen <i>foxp3</i> de humano .....	14
Figura 4. Esquema de los vectores pGL4.12 y pGL3-Control utilizados para la transfección.....	24
Figura 5. Diseño del experimento de transfección .....	25
Figura 6. Identificación de la secuencia putativa del promotor central del <i>foxp3</i> de cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono identificadas en el cromosoma X de cada especie.....	28
Figura 7. Alineamiento que incluye 450 pb corriente arriba del TSS del promotor central del <i>foxp3</i> de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino, ChX de perro, ChX de rata, ChX de caballo y ChX de mono .....	31
Figura 8. Amplificación de la región que contiene el potencial promotor central del <i>foxp3</i> de cerdo.....	33
Figura 9. Alineamiento de nucleótidos de la secuencia del promotor central del <i>foxp3</i> de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado (pFoxp3).....	34
Figura 10. Productos amplificados obtenidos a partir del vector pCR 2.1-TOPO-pFoxp3 .....	35

Figura 11. Amplificación del pFoxp3 de colonias transformadas y del plásmido pGL4.12 clonado con el pFoxp3..... 37

Figura 12. Alineamiento de la secuencia del promotor central del foxp3 de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado del vector pGL4.12-pFoxp3 ..... 37

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de identidad a nivel de las secuencias de nucleótidos del potencial promotor central del <i>foxp3</i> de cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono en el cromosoma X de cada especie.....	30
Tabla 2. Identidades nucleotídicas (%) resultado del alineamiento que incluye 450 pb corriente arriba del TSS del promotor del <i>foxp3</i> de ratón, humano, cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono .....	32
Tabla 3. Identidades nucleotídicas (%) resultado del alineamiento de la secuencia del promotor central del <i>foxp3</i> de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado (pFoxp3) .....	34
Tabla 4. Identidad nucleotídica (%) resultado del alineamiento de la secuencia del promotor central del <i>foxp3</i> de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado del vector pGL4.12-pFoxp3 .....	39
Tabla 5. Plásmidos transfectados y unidades de luminiscencia obtenidas con cada uno de ellos.....	40

## RESUMEN

Los linfocitos T reguladores son células muy importantes para mantener la homeostasis de la respuesta inmune y como en otras especies, en el cerdo también se ha identificado este tipo celular. El Foxp3 es un factor de transcripción y al mismo tiempo el marcador más importante para identificar a linfocitos T reguladores, ya que es esencial para su diferenciación y función. Existen diversos factores que activan el promotor del *foxp3* e inducen la expresión del Foxp3; en ratón y humano se ha observado que el factor transformante del crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) es uno de los más importantes. Sin embargo, en el cerdo se desconocen por completo las características del promotor del *foxp3* y los factores que inducen su expresión. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del TGF- $\beta$  en la actividad del promotor del gen *foxp3* de cerdo en células HEK293. En esta tesis se identificó, por homología con otras especies, una región que corresponde al promotor central del *foxp3* de cerdo en la secuencia del cromosoma X. Se diseñaron iniciadores específicos para amplificar y secuenciar esta región a partir de ADN de timo de cerdo. Los resultados revelan que dicha secuencia nucleotídica presenta 71.5 % y 77.5 % de identidad con la secuencia del promotor central de ratón y humano, respectivamente. Asimismo, presenta la caja TATA a -41 pb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción, la GC a -151 pb y la CAAT a -257 pb. En dicha secuencia, se localizaron los sitios de unión a los factores de transcripción NFAT, AP-1, NF- $\kappa$ B, GATA y STAT característicos del promotor central del *foxp3*. El posible promotor central del *foxp3* de cerdo se clonó en el vector pGL4.12 que codifica para la proteína reportera luciferasa y se transfectaron células HEK293 con el mismo. Los resultados preliminares muestran que la actividad del promotor central del *foxp3* de cerdo fue 5.7 veces mayor en presencia de TGF- $\beta$  con respecto al

control sin estímulo. Esto, a pesar de ser un resultado preliminar indica que posiblemente el TGF- $\beta$  activa al promotor del *foxp3* de cerdo e induce la expresión de este gen.



## INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es fundamental para mantener un buen estado de salud ya que protege al organismo contra patógenos invasores y evita la transformación de células sanas en células tumorales. Sin embargo, como en todo sistema ocurren fallas y se generan trastornos que llevan al desarrollo de enfermedades. Entre estos trastornos se pueden incluir respuestas inmunes aberrantes dirigidas hacia agentes no propios inofensivos o células propias, que desencadenan severas patologías o procesos autoinmunes. En el organismo, existen muchos mecanismos regulatorios del sistema inmune y uno de los cuales son los linfocitos T reguladores (Tregs) (Abbas et al., 2008).

Los linfocitos Tregs son una subpoblación de linfocitos T cooperadores (T helper, Th) que ejercen diversas funciones en el sistema inmune, como la prevención de enfermedades autoinmunes, represión de alergias y asma, el control de la magnitud de la respuesta inmune por células Th efectoras, etc. Sin embargo, todas estas funciones conducen a mantener la tolerancia hacia antígenos propios y proteger al huésped de una respuesta inmune exagerada hacia antígenos extraños (Corthay, 2009). El factor de transcripción Forkhead Box P3 (Foxp3) es un gen regulador elemental para la diferenciación de Tregs (Hori et al., 2003a). Debido a la importancia de Tregs en la regulación del sistema inmune, se han tratado de identificar los factores que promueven la expresión de Foxp3 y por lo tanto la diferenciación de Tregs. En el cerdo, uno de estos factores podría ser el TGF- $\beta$  (Factor transformante de crecimiento  $\beta$ ).

El TGF- $\beta$  es una citocina que regula la actividad de diferentes tipos celulares y se ha demostrado que es capaz de inducir células Tregs CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> a partir de linfocitos Th Foxp3<sup>-</sup>. Asimismo, se ha observado que en el ratón, es pieza clave en la inducción de la expresión del factor de transcripción Foxp3 (Chen et al.,

2003). Sin embargo, existe gran controversia en cuanto al mecanismo de señalización que induce esta citocina para promover la expresión de este gen. En el cerdo se desconoce por completo el efecto de esta citocina en la expresión del Foxp3. Así, el objetivo de este trabajo de investigación es evaluar el efecto del TGF- $\beta$  en la actividad del promotor del gen *foxp3* de cerdo en células HEK293.

## **ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

### **Linfocitos T**

Los linfocitos T están involucrados en la respuesta inmune de tipo celular y son muy importantes en el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmune. Los principales dos subconjuntos de células T son los linfocitos T cooperadores (CD4) y linfocitos T citotóxicos (CD8). Las células T cooperadoras se encargan de regular la respuesta inmune mediante la producción de citocinas y quimiocinas. Estas células activan a linfocitos B, linfocitos T citotóxicos (CTL), células asesinas naturales (natural killer, NK) y macrófagos, además reclutan células efectoras en los sitios de infección e inflamación. Las células T citotóxicas (CD8) llevan a cabo la función efectora de la respuesta celular. Son capaces de reconocer células anfitrionas infectadas por virus o por otros microorganismos intracelulares y destruirlas mediante la secreción de proteínas que generan la apoptosis (Abbas et al., 2008; Zhu y Paul, 2008).

#### **Clasificación y función de linfocitos T cooperadores**

Los linfocitos T cooperadores son conocidos también como células Th (del inglés T helper). Se clasifican de acuerdo al tipo de citocina que producen en: Th1, Th2, Th17 y T reguladores (Tregs). Los linfocitos Th1 secretan principalmente interferón (IFN)- $\gamma$  que promueve una respuesta inmune contra patógenos intracelulares. Las células Th2 secretan interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-

13, las cuales favorecen la producción de anticuerpos ayudando al huésped a defenderse de parásitos extracelulares. Las células Th17 producen principalmente IL-17 y promueven respuestas inmunes contra bacterias extracelulares y hongos. Así también, son responsables en la participación de la inducción de varias enfermedades autoinmunes órgano-específicas. Los Tregs (cuyo fenotipo característico es CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) se caracterizan por producir IL-10, TGF-β e IL-35, y su función es la de suprimir la respuesta inmune (Abbas et al., 2008; Zhu y Paul, 2008)

## **Linfocitos T reguladores**

El concepto de regulación mediado por células T supresoras fue descrito por primera vez en 1970 (Gershon y Kondo, 1970). Sin embargo, debido a que no se pudo identificar ningún tipo de marcador celular o molécula soluble específica, el concepto fue abandonado por algún tiempo. Fue hasta 1995 que éstas células fueron identificadas como T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> con actividad supresora, a las que se les denominó T reguladoras (Sakaguchi et al., 1995). Más adelante, se descubrió el factor de transcripción Foxp3 como el marcador celular más específico de los Tregs, así como un regulador crítico en el desarrollo, función y la homeostasis de estas células (Hori et al., 2003b). La primera evidencia que destacaba la importancia de los Tregs se observó en pacientes que presentaban mutaciones en *foxp3*. Éstos, desarrollaban una enfermedad autoinmune fatal llamada síndrome de inmunodeficiencia, poliendocrinopatía, enteropatía, ligado al cromosoma X (IPEX) (Gambineri et al., 2003). A partir de este hallazgo, rápidamente se hizo evidente la importancia de los Tregs en la regulación del sistema inmune.

## ***Función de los Tregs***

Desde su descubrimiento hasta la fecha, a los Tregs se les han atribuido diversas funciones que han ayudado a esclarecer lo que hacen realmente en el sistema inmune. Actualmente se conocen al menos 9 funciones que no son exclusivas de estas células, como son: prevención de enfermedades autoinmunes, represión de alergias y asma, inducción y tolerancia contra antígenos de la dieta, represión de inmunopatologías inducidas por patógenos, regulación de las células efectoras en la respuesta inmune, inducción de tolerancia materna contra el feto, represión de la activación de células T desencadenada por estímulos débiles, control de la magnitud de la respuesta inmune por células Th efectoras y protección de eliminación de bacterias comensales por el sistema inmune (Corthay, 2009).

Por lo tanto, los Tregs presentan diversas funciones en el organismo. Sin embargo, la mayoría están encaminadas a mantener la tolerancia hacia antígenos propios, proteger al huésped de una respuesta exagerada hacia antígenos extraños y así, mantener un buen estado de salud.

## ***Clasificación y diferenciación***

De acuerdo al sitio donde se desarrollan, los Tregs se dividen en dos subpoblaciones: Tregs naturales (nTregs) y Tregs inducidos (iTregs).

Los nTregs se originan en el timo y posteriormente migran a tejidos periféricos y producen IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  para ejercer sus efectos sobre diversas células

como las T cooperadoras, células dendríticas (DCs), macrófagos, linfocitos B, etc. En dichos tejidos expresan marcadores celulares de superficie entre los que destaca la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2 (CD25), así como el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el gen activador de linfocitos 3 (LAG-3), el glucocorticoide inductor del receptor de la familia de moléculas del factor de necrosis tumoral (GITR) y las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Asimismo, expresan el factor de transcripción Foxp3 y moléculas de coestimulación como CD28 y CD40L (Figura 1) (Corthay, 2009).

Se ha demostrado que las citocinas IL-2 y TGF- $\beta$  son muy importantes para el mantenimiento de nTregs. Debido a que estas células expresan el receptor de alta afinidad a IL-2 (CD25) y no pueden producir esta citocina, dependen de la producción parácrina para su supervivencia y crecimiento (Su et al., 2004). El TGF- $\beta$  es importante para el desarrollo de los nTregs ya que se requiere para mantener la expresión de Foxp3 y la función supresora periférica de estas células *in vitro* e *in vivo* (Marie et al., 2005).

Los iTregs son generados en tejidos periféricos a partir de células T convencionales y comparten marcadores moleculares de superficie con nTregs tales como CD25, CTLA-4, GITR, etc. Se han descrito 2 subconjuntos de iTregs en base a las citocinas que causan su inducción: Tr1 Foxp3<sup>-</sup>, inducidos por IL-10 y Th3 Foxp3<sup>+</sup>, por TGF- $\beta$  (Figura 1) (Weiner, 2001; Vieira et al., 2004). Las células Tr1 Foxp3<sup>-</sup> y Th3 Foxp3<sup>+</sup> ejercen su acción supresora a través de las citocinas por las cuales son inducidas.

Además de IL-10 y TGF- $\beta$ , existen otros factores que promueven la diferenciación de iTregs entre los que se encuentran las células presentadoras de antígenos (APCs). Especialmente las células dendríticas CD103<sup>+</sup> del tejido linfoide asociado a intestino (GALT) (Mucida et al., 2007) y macrófagos de lámina propia (Figura 1) son capaces de promover la generación de iTregs en

estos tejidos (Denning et al., 2007). También se ha observado que las DCs de cerdo infectadas con el virus del PRRS aumentan la población de Tregs CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Silva-Campa et al., 2009).

De lo anterior, se puede concluir que IL-10, TGF- $\beta$  y Foxp3 son esenciales para el desarrollo de Tregs, así como para que ejerzan su actividad reguladora.

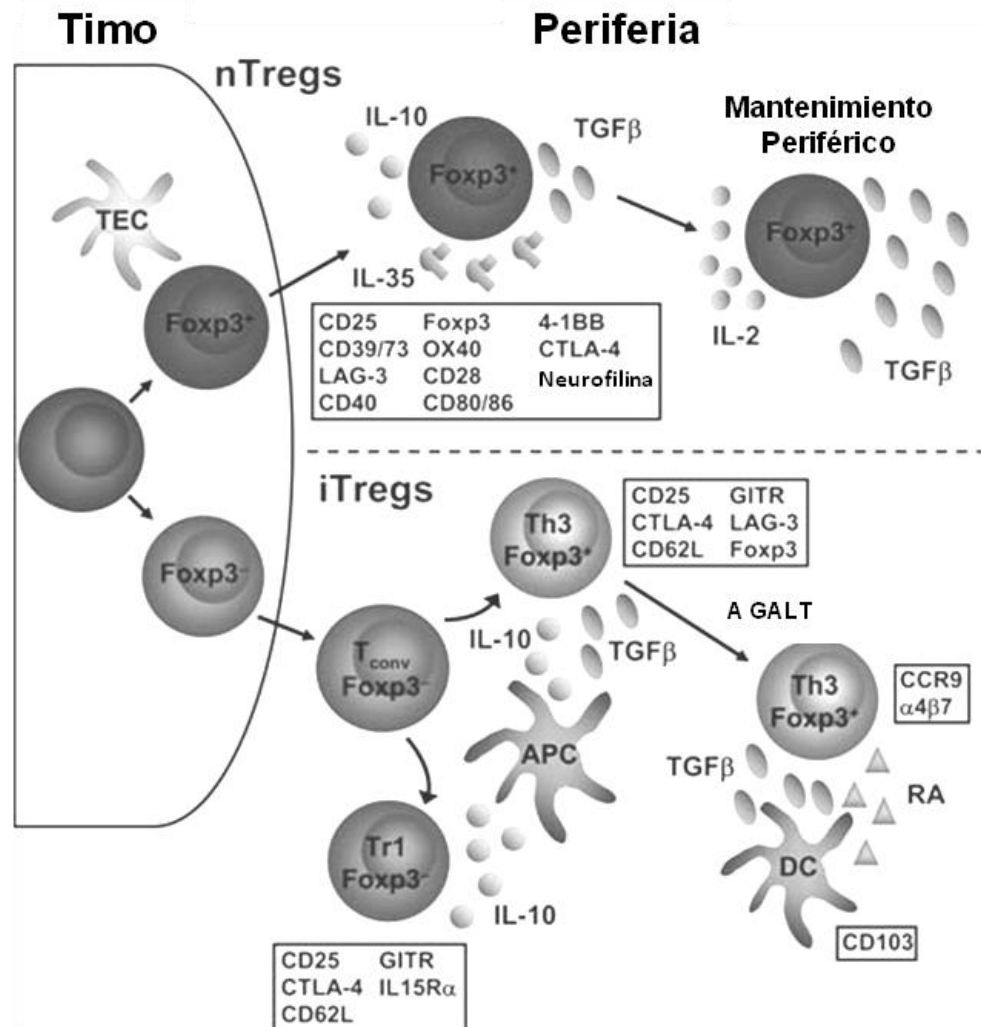


Figura 1. Desarrollo de nTregs e iTregs y los marcadores asociados. Tomado de Workman et al., (2009).

### ***Mecanismos de supresión***

Los mecanismos de acción que utilizan los linfocitos T reguladores para llevar a cabo sus funciones siguen siendo poco conocidos y controversiales. Dichos mecanismos pueden ser divididos en tres categorías: interacciones célula-célula, secreción local de citocinas inhibitorias y competencia local por factores de crecimiento.

La interacción célula-célula probablemente es el mecanismo de supresión más controversial. Este mecanismo es mediado principalmente a través de la interacción de las moléculas de superficie de células T reguladoras, tales como CTLA-4 y LAG-3, y su interacción con CD80/CD86 y el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHCII), respectivamente en la APC (Sojka et al., 2008; Tang y Bluestone, 2008; Corthay, 2009). Esta interacción resulta en la disminución de la capacidad de las APCs para activar células T convencionales. Asimismo, se ha observado que el TGF- $\beta$  unido a membrana contribuye a la supresión (Nakamura et al., 2001), al igual que otras moléculas citolíticas como Fas, granzima B en ratones y granzima A en humanos (Gondek et al., 2005; Cao et al., 2007)

Recientemente, se han realizado varios estudios que describen nuevos mecanismos de supresión de Treg mediados por alteración del metabolismo. Se ha descrito que la expresión de CD73 y CD39 (ectonucleotidasas) incrementan la producción de AMP cíclico (AMPc), el cual se ha asociado a la inhibición de la proliferación celular y la producción de citocinas en células efectoras (Sojka et al., 2008; Tang y Bluestone, 2008; Corthay, 2009)



Las citocinas inhibitorias IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 son expresadas en células T reguladoras y se consideran un importante mecanismo de represión utilizado por las mismas. (Sojka et al., 2008; Tang y Bluestone, 2008; Corthay, 2009).

Por último, se ha descrito que la competencia por factores de crecimiento (IL-2), es otro mecanismo de supresión. Se ha observado que en cocultivos los Tregs privan de IL-2 a las células efectoras. Lo anterior se debe al hecho de que los Tregs expresan altos niveles de CD25 y las células T vírgenes lo expresan después de su activación. Además, la absorción de IL-2 activa a Tregs y así se incrementa la producción de IL-10 (Sojka et al., 2008).

### **Linfocitos T reguladores de cerdo**

Al igual que en otras especies, se han identificado linfocitos T reguladores en cerdo (Kaser et al., 2007). Éstos presentan la capacidad de suprimir la respuesta inmune (Kaser et al., 2007) y hasta la fecha se han descrito dos fenotipos de éstas células: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Kaser et al., 2008). En un estudio donde se evaluó la función de las células Tregs se identificaron dos subconjuntos de las mismas derivadas de linfocitos T de sangre y tejidos linfoides secundarios. Estos subconjuntos son: células CD4<sup>+</sup> con baja expresión de CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>dim</sup>) y células CD4<sup>+</sup> con alta expresión de CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>). Ambos subconjuntos tienen la capacidad de producir IL-10 y solamente las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> presentan la capacidad de suprimir la proliferación de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Kaser et al., 2007).

En un estudio reciente se encontró que las células T reguladoras de cerdo requieren de la citocina IL-2 exógena así como el estímulo del TCR (Receptor

de células T) para vencer su estado anérgico. Una vez activadas, utilizan los tres mecanismos de supresión descritos anteriormente: interacción célula-célula, secreción de la citocina IL-10 (inhibitoria) y competencia por el factor de crecimiento IL-2. Así también, la supresión afecta la activación de células Th, CTL y TCR- $\gamma\delta$  (Kaser et al., 2011).

### Foxp3

El Foxp3 (*Forkhead box P3*) es un miembro de la familia de las proteínas Fox (*Forkhead box*). Éstas, son factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en el crecimiento, proliferación, diferenciación y longevidad celular. La característica distintiva de las proteínas Fox es la caja *forkhead* (llamada también *winged hélix*), formada por 80 a 100 aminoácidos que constituyen el dominio de unión a ADN. Los miembros de la familia Fox pueden ser activadores o represores transcripcionales (Bucknera y Zieglerb, 2008).

El factor de transcripción Foxp3 es una proteína que se encuentra altamente conservada en bovinos, felinos, caninos, murinos, macacos, y humanos. De hecho, las secuencias de aminoácidos del Foxp3 de humano y de ratón tienen 86% de identidad y 91% de similitud en sus aminoácidos (Lankford et al., 2008).

El Foxp3 es el marcador celular más específico de linfocitos T reguladores y es esencial para la diferenciación y función de estas células. Esto ha sido comprobado en estudios con retrovirus y células de ratones. La incorporación del gen *foxp3* al genoma de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> con retrovirus, promueve su conversión en Tregs y la represión de la proliferación de las células T

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> no infectadas *in vitro* (Hori et al., 2003b). Las células infectadas, por su parte, presentan actividad reguladora *in vivo*, ya que protegen al huésped del desarrollo de enfermedades autoinmunes (Tang et al., 2004).

La generación de ratones transgénicos con una expresión excesiva de Foxp3, permite conocer la función de Foxp3 *in vivo*. En estos ratones, aproximadamente el 80% de células T CD4<sup>+</sup> producen dicho factor de transcripción y presentan actividad reguladora *in vitro* (Khattari et al., 2003a; Kasprovicz et al., 2005). Por otra parte, ratones a los que se les induce alguna mutación en *foxp3*, producen una proteína carente de funcionalidad, y por lo tanto no son capaces de promover la generación de Tregs (Fontenot et al., 2005).

En base a lo anterior, se puede concluir que la expresión de Foxp3 es indispensable para el desarrollo y la función de linfocitos T reguladores.

### **Vías de señalización que inducen la expresión de Foxp3**

Los mecanismos moleculares que regulan la expresión del Foxp3 son poco conocidos. Existen varias señales que actúan en conjunto para regular la expresión del factor de transcripción Foxp3. Entre ellas se incluye la unión del TCR con el MHC-II, la coestimulación a través de CD28, la participación de la IL-2 y la importante señal emitida por el reconocimiento del TGF- $\beta$  a través de su receptor. Estos eventos resultan en la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de *foxp3* mediante su unión a la región promotora del gen. Entre los factores de transcripción que se activan se incluye la proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (CREB), el factor de transcripción activador (ATF), el factor nuclear de activación de células T

(NFAT), el activador de la proteína 1 (AP1), el gen de respuesta temprana inducible por TGF- $\beta$  1 (TIEG1), el factor madre del homólogo decapentaplégico (SMAD3), el transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5) y recientemente se ha reportado que STAT1 lleva a cabo la misma función (Ouaked et al., 2009). Sin embargo, la contribución de cada vía en la activación o represión de la expresión de Foxp3 puede diferir entre los distintos tipos de células T (Figura 2) (Huehn et al., 2009).

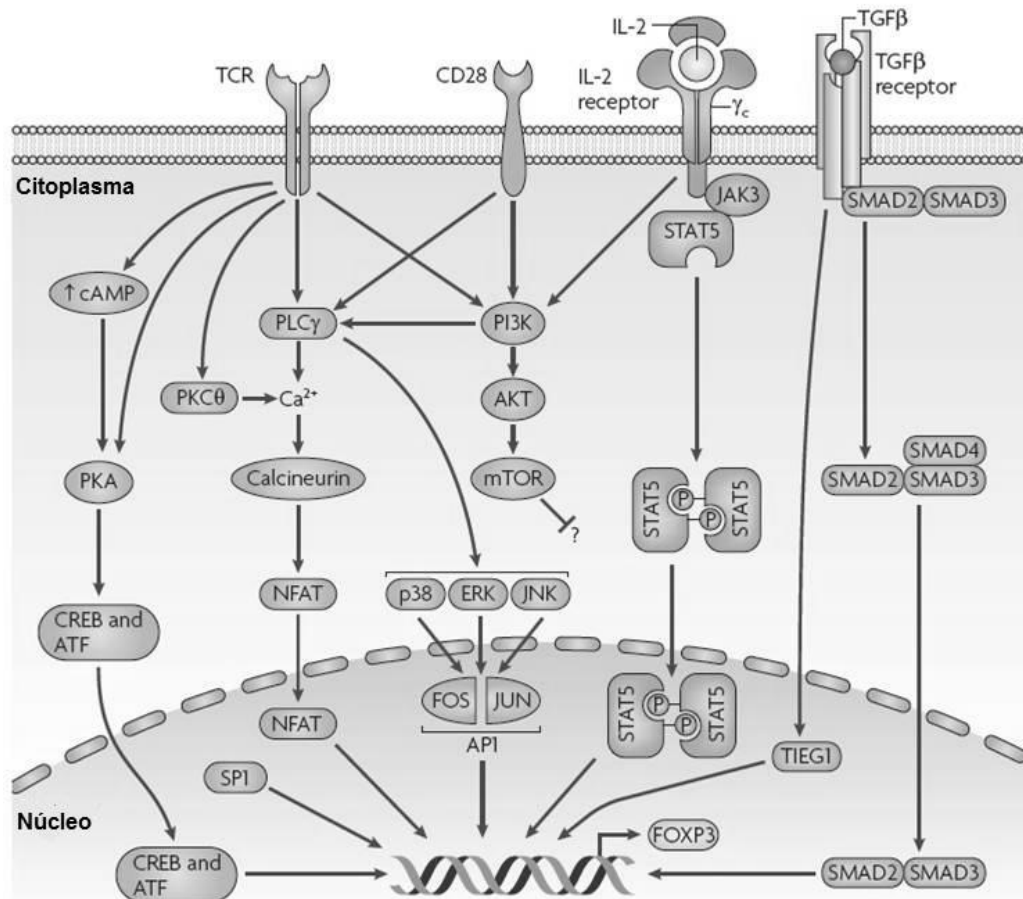


Figura 2. Vías de señalización que inducen la expresión de Foxp3. Tomado de Huehn et al., (2009).

### **Estructura del gen *foxp3***

El *foxp3* es un gen que actúa como “regulador maestro” en el desarrollo de células T reguladoras y se requiere su expresión constitutiva para que dichas células lleven a cabo su función supresora.

En murinos al igual que en bovinos, que el gen *foxp3* posee 14 exones (Brunkow et al., 2001). El de humanos y macacos presenta 12 exones y en el caso de caninos y ratas, el gen tiene 11 exones.

Se ha observado que en humanos, el sitio de inicio de la transcripción del *FOXP3* está localizado 6211 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción. El extremo 5' no traducido se encuentra interrumpido por el intrón 0 de 6011 pb. Inmediatamente corriente arriba del sitio de inicio de transcripción del *FOXP3* (-511 a +176) se encuentra una región que posee varios sitios de unión a factores de transcripción (AP-1, NFAT) con características indicativas de los promotores eucariotas, incluyendo las cajas TATA, GC y CAAT. Esta región actúa como un promotor de la transcripción del *FOXP3* y se conoce como la región del promotor proximal, promotor central o promotor “core”. Están presentes otros elementos reguladores *cis* en el intrón 0, y a éstos se les conoce como potenciadores intrónicos (Figura 3) (Mantel et al., 2006).

### **Foxp3 de cerdo**

En los cerdos, se ha determinado la secuencia de aminoácidos y nucleótidos del factor de transcripción Foxp3. La proteína está formada por 432

aminoácidos y presenta gran homología con las secuencias de otras especies de mamíferos, en especial la de bovinos con la que comparte el 95%. La secuencia de nucleótidos del gen *foxp3* que se conoce incluye 1518 pb. En la misma, se encuentran especificados los 1296 pb que codifican para la proteína y segmentos cortos de las secuencias no traducidas (UTRs) del extremo 5' y 3' (Bolzer et al., 2009). Sin embargo, la secuencia del promotor aún no ha sido identificada.

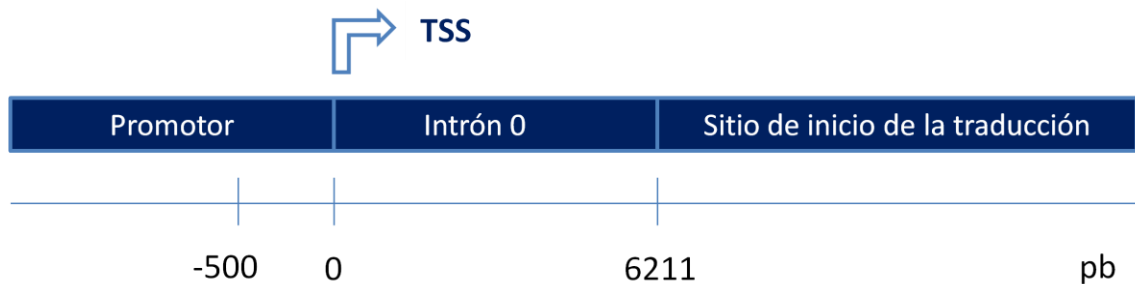


Figura 3. Esquema del gen *foxp3* de humano. Se encuentra señalado el sitio de inicio de la transcripción (TSS), el sitio de inicio de la traducción y la región del promotor del *foxp3*.

## TGF- $\beta$

El factor transformante de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) es un regulador general de las actividades celulares con múltiples efectos biológicos. Es una citocina que pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento y es sintetizada por diferentes tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, astrocitos, células epiteliales, células de riñón, células de

placenta y plaquetas, así como por algunas células tumorales ( Lyons y Moses, 1990; da Cunha y Vitkovic, 1992; Steigerwalt et al., 1992). El TGF- $\beta$  tiene efectos sobre la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular que afectan múltiples procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, carcinogénesis, fibrosis, cicatrización de heridas y la respuesta inmune (Blobe et al., 2000).

### **Diferenciación de Tregs**

Durante mucho tiempo se ha tenido gran interés en la comprensión de la regulación de la inmunidad de células T y la tolerancia que promueve el TGF- $\beta$  (Chen y Wahl, 1999, 2002, 2003). Antes de que el *foxp3* se identificara como el gen "regulador maestro" para el desarrollo de las células Treg (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003b; Khattry et al., 2003b), se demostró que el TGF- $\beta$  era capaz de inducir células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> anérgicas/supresoras a partir de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes en ratones (Chen et al., 2003).

A partir del descubrimiento del *foxp3* como un gen crítico en Tregs, se ha reportado que el TGF- $\beta$  junto con la estimulación por TCR, promueve la expresión del Foxp3 en células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> periféricas vírgenes y las convierte en células Tregs Foxp3<sup>+</sup> (Chen et al., 2003). Lo anterior se ha confirmado tanto en ratones como en humanos (Fantini et al., 2004; Fu et al., 2004). Asimismo, en estudios con ratones transgénicos en los que sólo células T Foxp3<sup>+</sup> expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína roja fluorescente (RFP), se demostró que el TGF- $\beta$  es capaz de convertir células T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> en células T reguladoras Foxp3<sup>+</sup> (Wan y Flavell, 2005; Bettelli et al., 2006).

Varios grupos de investigación han comprobado que el TGF- $\beta$  es necesario en células T CD4<sup>+</sup> para inducir la expresión de Foxp3. Por otro lado, las células T CD4<sup>+</sup> con una deficiente señalización en TGF- $\beta$  no son capaces de convertirse en células Tregs Foxp3<sup>+</sup> *in vitro* o *in vivo* (Apostolou et al., 2008; Liu et al., 2008). Se ha demostrado que IL-2 es fundamental para facilitar la inducción de la expresión de Foxp3 mediada por TGF- $\beta$  en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes, aunque por sí sola es incapaz de inducir la expresión de Foxp3 (Davidson et al., 2007; Zheng et al., 2007)

Por otra parte, el aumento sistémico de TGF- $\beta$  promueve un incremento sustancial en el número de células Treg Foxp3<sup>+</sup> en ratones (Luo et al., 2007; Perruche et al., 2008).

Por lo anterior, se puede concluir que el TGF- $\beta$  es esencial en la diferenciación del células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>.

### **Regulación de la transcripción de Foxp3**

A pesar del consenso general de que el TGF- $\beta$  en el contexto de la estimulación por TCR induce la expresión de Foxp3 en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes, los mecanismos moleculares de señalización no están bien definidos. En la actualidad, se conoce que tanto la señalización del TCR y del TGF- $\beta$  son esenciales, ya que un estímulo único no promueve la expresión del Foxp3.

Se cree que la inducción de la expresión de Foxp3 puede ser mediada por las vías de señalización dependiente o independiente de SMAD (Derynck y Zhang, 2003). Estudios han demostrado, al menos *in vitro*, que SMAD3 (Tone et al., 2007) y/o SMAD4 se requieren para la inducción de Foxp3 mediada por TGF- $\beta$



en células T CD4<sup>+</sup> vírgenes. Las células T CD4<sup>+</sup> que carecen de cualquiera de estos genes muestran un defecto marcado en la inducción de Foxp3.

El mecanismo de señalización del TGF- $\beta$  para la expresión de Foxp3 dependiente de SMAD, al menos en ratones, consiste en la inducción de la activación de SMAD3 (SMAD fosforilado, pSMAD3). Éste, ejerce un efecto como un factor de transcripción de gran alcance para el gen *foxp3*. Se ha observado que inicialmente SMAD3 se une a un sitio potenciador en el intrón 2 y luego interactúa con los componentes del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), NFATc2 y CREB, y éstos forman un complejo potenciador que se une al promotor del *foxp3*. Cabe señalar, que en ratón no hay sitios de unión a SMAD3 en el promotor del *foxp3* y por lo tanto SMAD3 probablemente modifica la actividad del promotor indirectamente a través de la unión a otros componentes del complejo potenciador (Tone et al., 2007).

Según Derynck y Zhang, (2003) es posible que TGF- $\beta$  induzca la expresión de Foxp3 través de una vía de señalización independiente de SMAD. Esta posibilidad podría sugerir que la señal de TCR junto con la señal del TGF- $\beta$ , dirige la transcripción del *foxp3* en células T CD4<sup>+</sup>. En este escenario, la señal del TGF- $\beta$  sirve como cofactor, probablemente como un inhibidor, y la señal del TCR como el inductor principal. La evidencia experimental a favor de esta posibilidad incluye la demostración de que algunos de los factores de transcripción de células T, tales como NFAT y AP-1, se unen directamente al promotor del *foxp3* (Wu et al., 2006). GATA-3, un factor de transcripción crítico en la diferenciación de las células Th2, también puede unirse al promotor del *foxp3* (Mantel et al., 2007). Por otra parte, ROR $\gamma$ t, el factor de transcripción maestro en la diferenciación de las células Th17, interacciona físicamente con el *foxp3*. Esto podría resaltar un nivel de regulación mutua entre células Foxp3<sup>+</sup> y las Th17 (Zhou et al., 2008).

Existen estudios en humano y ratón donde se ha tratado de conocer la forma en que el TGF- $\beta$  induce la expresión del Foxp3. Sin embargo, aún existe gran controversia en cuanto al mecanismo molecular de señalización que promueve el TGF- $\beta$  en la expresión del Foxp3. Por otro lado, hasta el momento no existe ninguna información al respecto en el caso del cerdo.

## **HIPÓTESIS**

El TGF- $\beta$  induce la actividad del promotor de Foxp3 de cerdo

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar el efecto del TGF- $\beta$  en la actividad del promotor del gen Foxp3 de cerdo en células HEK293.

### **Particulares**

1. Amplificar la región promotora central del *foxp3* de cerdo y obtener la secuencia.
2. Clonar la región promotora central de *foxp3* de cerdo en el vector pGL4.12 que expresa una luciferasa como gen reportero.
3. Cuantificar la actividad del promotor de Foxp3 a través de la expresión de luciferasa en células HEK293 transfectadas con pGL4.12-pFoxp3 y estimuladas con TGF- $\beta$ .

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Herramientas bioinformáticas**

Las secuencias de ADN utilizadas para este trabajo se obtuvieron del GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> y de Ensembl Genome Browser: [www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html). Dichas secuencias se analizaron con el programa Bioedit 7.0.9.0. Asimismo, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas con el algoritmo BLAST comparando con la base de datos del GenBank.

Las características de los iniciadores diseñados para amplificar el promotor central del *foxp3* de cerdo se verificaron utilizando el “DNA calculator” de Sigma: <http://www.sigma-geosys.com/calc/DNACalc.asp>

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de tejido de timo y células T CD4<sup>+</sup> de cerdo. Se utilizaron columnas de separación “DNeasy Blood & Tissue Kit” (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

## **Amplificación del promotor central del *foxp3* porcino**

El promotor del *foxp3* de cerdo fue amplificado mediante PCR convencional con iniciadores específicos. Los iniciadores utilizados fueron Fw90: 5' AGCCAGCGATTCTCAGACTCTTG 3' y Rv940: 5' CTTGGTGAAGTGGACTGACAGAA 3'. Las reacciones se realizaron en 50 µL que contenían 5 µL del buffer de reacción 10X, dNTPs 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 10 µM de cada primer, 1.2 U de Taq ADN Polimerasa y 300 ng de templado. Las condiciones de los ciclos térmicos fueron: 94 °C por 3 min, seguidos de 42 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C. Se tomaron alícuotas de 10 µL de cada producto de PCR y los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis, en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con SYBR Safe® (Invitrogen).

## **Purificación de productos amplificados y secuenciación**

Los productos amplificados se purificaron con las columnas GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) y se secuenciaron por el método de Sanger en el Genomic Analysis and Technology Core, GATC (Universidad de Arizona).

## **Clonación de la región promotora de *foxp3* de cerdo en el vector pCR 2.1-TOPO**

El producto amplificado y purificado se clonó inicialmente en el vector pCR 2.1-TOPO utilizando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen), siguiendo las instrucciones de proveedor. Las bacterias transformadas se cultivaron en placas con medio LB con ampicilina (100 µg/mL) a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se inocularon 5 mL de medio LB (Sigma) líquido con ampicilina (100 µg/mL) (Sigma) con una colonia de células de *E. coli* portadora del plásmido. Se cultivaron las células bacterianas durante 24 horas a 37 °C, con agitación orbital (220 rpm). Por último se realizaron minipreps (Birnboim y Doly, 1979) para extraer el ADN plasmídico.

## **Clonación de la región promotora de *foxp3* de cerdo en el vector pGL4.12**

Se realizó una PCR para amplificar el producto clonado en el vector pCR 2.1-TOPO y el amplicón obtenido se clonó en el vector pGL4.12 (Promega) como se describe a continuación. El vector pGL4.12 y el producto de PCR se digirieron con las enzimas de restricción KpnI (Biolabs) y HindIII (Biolabs) siguiendo las recomendaciones del proveedor. El vector y el producto de PCR digeridos, se ligaron con la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se obtuvo el plásmido pGL4.12-pFoxy3. El vector ligado con el inserto se utilizó para transformar células de *E. coli* químicamente competentes mediante choque térmico. Las bacterias transformadas se

cultivaron en placas con medio LB (Sigma) con ampicilina (100 µg/mL) (Sigma) a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se inocularon 5 mL de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/mL) con una colonia de células de *E. coli* portadora del plásmido. Se cultivaron las células bacterianas durante 24 horas a 37 °C, con agitación orbital (220 rpm). Finalmente se realizó la purificación de ADN plasmídico con el kit ChargeSwitch®-Pro (Plasmid Miniprep Kit Invitrogen).

## **Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular derivada de riñón embrionario humano (HEK293), la cual se cultivó en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con piruvato de sodio 2 mM (Sigma), L-glutamina 2 mM (Sigma), penicilina 100 UI/mL (Sigma), estreptomina 100 µg/mL (Sigma), anfotericina 1 µg/mL (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco).

## **Transfección y estimulación de células HEK293**

Se sembraron 150,000 células HEK293 en placas de cultivo de 24 pozos en 500 µL de medio RPMI con 10 % de SFB y antibióticos hasta obtener una confluencia aproximada del 90 %. Después de 24 horas de la siembra, las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X y se agregaron 500 µL de medio RPMI-1640 sin suero y libre de antibióticos.

Para la transfección se utilizaron 1.5  $\mu$ L de lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se transfectó un pozo con el plásmido pGL4.12 (Promega) (Figura 4) como control del ensayo, dos pozos con la construcción pGL4.12-pFoxp3 y un pozo con el vector pGL3-Control (Promega) (Figura 4) como control de transfección. Los plásmidos se utilizaron a una concentración de 800 ng de DNA/pozo. En la Figura 5 se esquematiza el diseño del experimento de transfección.

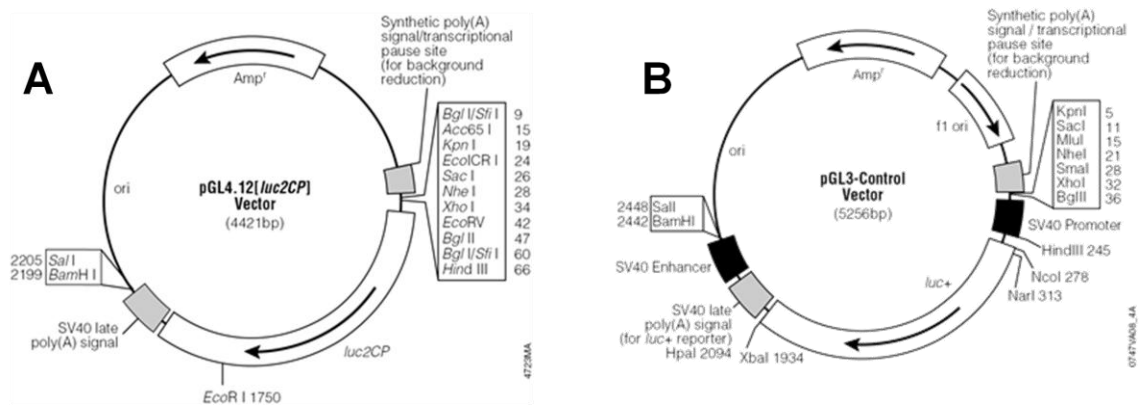


Figura 4. Esquema de los vectores pGL4.12 y pGL3-Control utilizados para la transfección. A) El vector pGL4.12 codifica el gen reportero luciferasa (*Photinus pyralis*) y no se encuentra regulado por ningún promotor. B) El vector pGL3-Control codifica el gen reportero luciferasa (*Photinus pyralis*), el cual se encuentra regulado por el promotor SV40, lo que resulta en una fuerte expresión de luciferasa.

La lipofectamina y el DNA fueron resuspendidos por separado en 50  $\mu$ L de medio RPMI sin suero y libre de antibióticos por cada pozo. Posteriormente se mezclaron entre sí para formar los complejos DNA-lipofectamina y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Ya incubados, se procedió a agregar los 100  $\mu$ L del respectivo complejo a cada uno de los pozos correspondientes.



Después de 6 horas de transfección e incubación a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, las células fueron lavadas con PBS 1X y se agregaron 500 µL de medio RPMI-1640 con 10 % de SFB y antibióticos. Posteriormente, uno de los pozos con células HEK293 transfectadas con la construcción pGL4.12-pFoxp3 fue estimulado con TGF-β porcino recombinante (5 ng/mL) (Figura 5 C). Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 h. Finalmente se evaluó la actividad del promotor por luminiscencia.

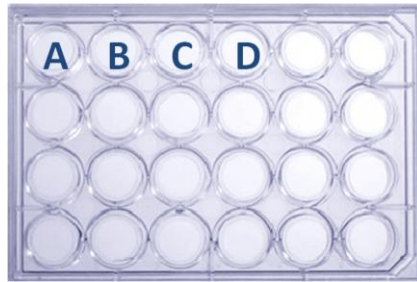


Figura 5. Diseño del experimento de transfección. Las células HEK293 fueron transfectadas con los plásmidos A) pGL4.12, B) pGL4.12-pFoxp3, C) pGL4.12-pFoxp3 + TGF-β (5 ng/mL) y D) pGL3-Control.

### **Ensayo de actividad del promotor por luminiscencia**

Después de 48 horas de la transfección se realizaron los ensayos de luminiscencia. Para estos se utilizó el kit Dual Luciferase Assay Reporter System (Promega). Las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, se agregaron 100 µL del reactivo de lisis (PLB), se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y agitación constante.

Las señales de bioluminiscencia fueron detectadas con el lector de microplacas multimodal FLUOStar Omega (BMG Labtech). Se transfirieron 20  $\mu$ L del lisado a una placa de 96 pozos, se agregaron 20  $\mu$ L del reactivo LAR II el cual contiene el sustrato para la luciferasa de luciérnaga y se realizó la medición de la emisión de luz.

## RESULTADOS

### Localización del promotor del *foxp3* en el cromosoma X

Las secuencias de nucleótidos de humano (NG\_007392), ratón (AF277994.1) y caballo (NC\_009175.2) analizadas en este trabajo, se obtuvieron del GenBank. Mientras que las secuencias de cerdo (ENSSSCT00000013445), bovino (ENSBTAG00000013279), perro (ENSCAFG00000015934), rata (ENSRNOG00000011702) y mono (ENSMMUG00000008624) se descargaron de Ensembl Genome Browser.

Se localizó la región codificante del *foxp3* de cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono en la secuencia del cromosoma X de cada especie. Posteriormente, se descargó la secuencia de dicho gen, así como 20,000 pb hacia el extremo 5' UTR y 3' UTR, para asegurar la inclusión de la región promotora. Se alinearon las secuencias obtenidas del cromosoma X de todas las especies mencionadas anteriormente, así como la del promotor del *foxp3* de ratón y humano. En el alineamiento se identificó la secuencia del promotor central o core del *foxp3* de humano y ratón, que ya han sido caracterizadas previamente (Mantel et al., 2006) (Figura 6).

Con base en la identificación de la secuencia del promotor central del *foxp3* de humano y ratón (Figura 6), se identificaron las posibles secuencias de los promotores del *foxp3* de cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono. Asimismo, se identificó el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y las cajas TATA, GC y CAAT en todas las secuencias analizadas. Se localizaron los sitios de unión a los factores de transcripción NFAT, AP-1 (Mantel et al., 2006) y NF- $\kappa$ B

(Eckerstorfer et al., 2010) (Figura 6). Se observó que tanto las cajas como los sitios de unión a factores de transcripción, se encuentran muy conservados entre especies (Figura 6).

Por lo tanto, con base en la identificación de las cajas TATA, GC y CAAT, y de los sitios de unión a los factores de transcripción antes mencionados, se generó un esquema putativo del promotor central del *foxp3* de cerdo. Asimismo, a partir de la generación de éste esquema, se diseñaron iniciadores específicos para amplificar dicha región reguladora en el cerdo. Éstos se denominaron Fw90 y Rv940 (Figura 6).

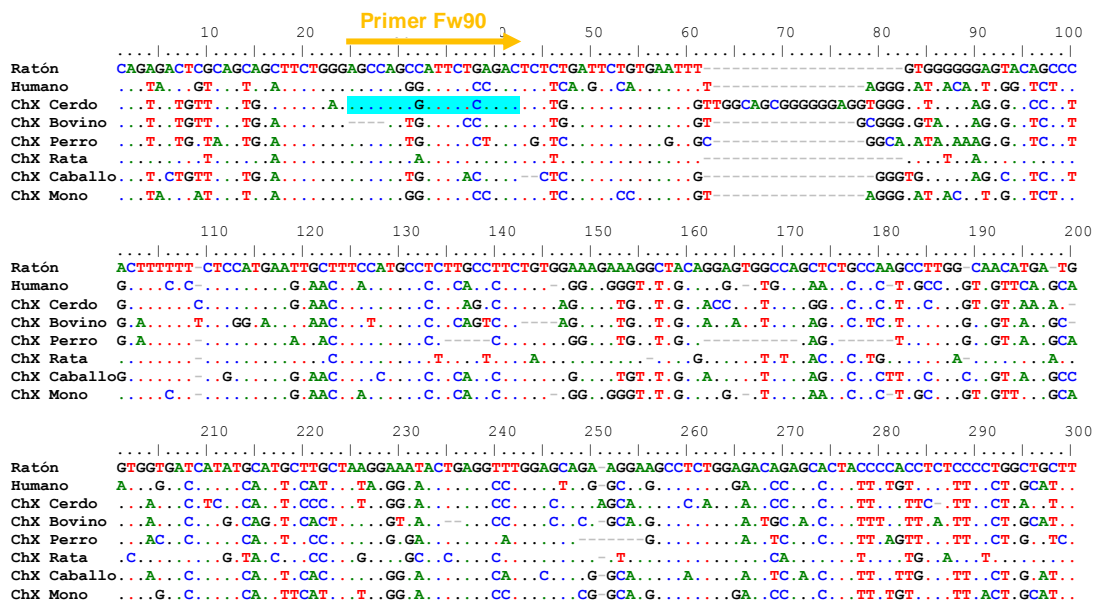


Figura 6. Continúa

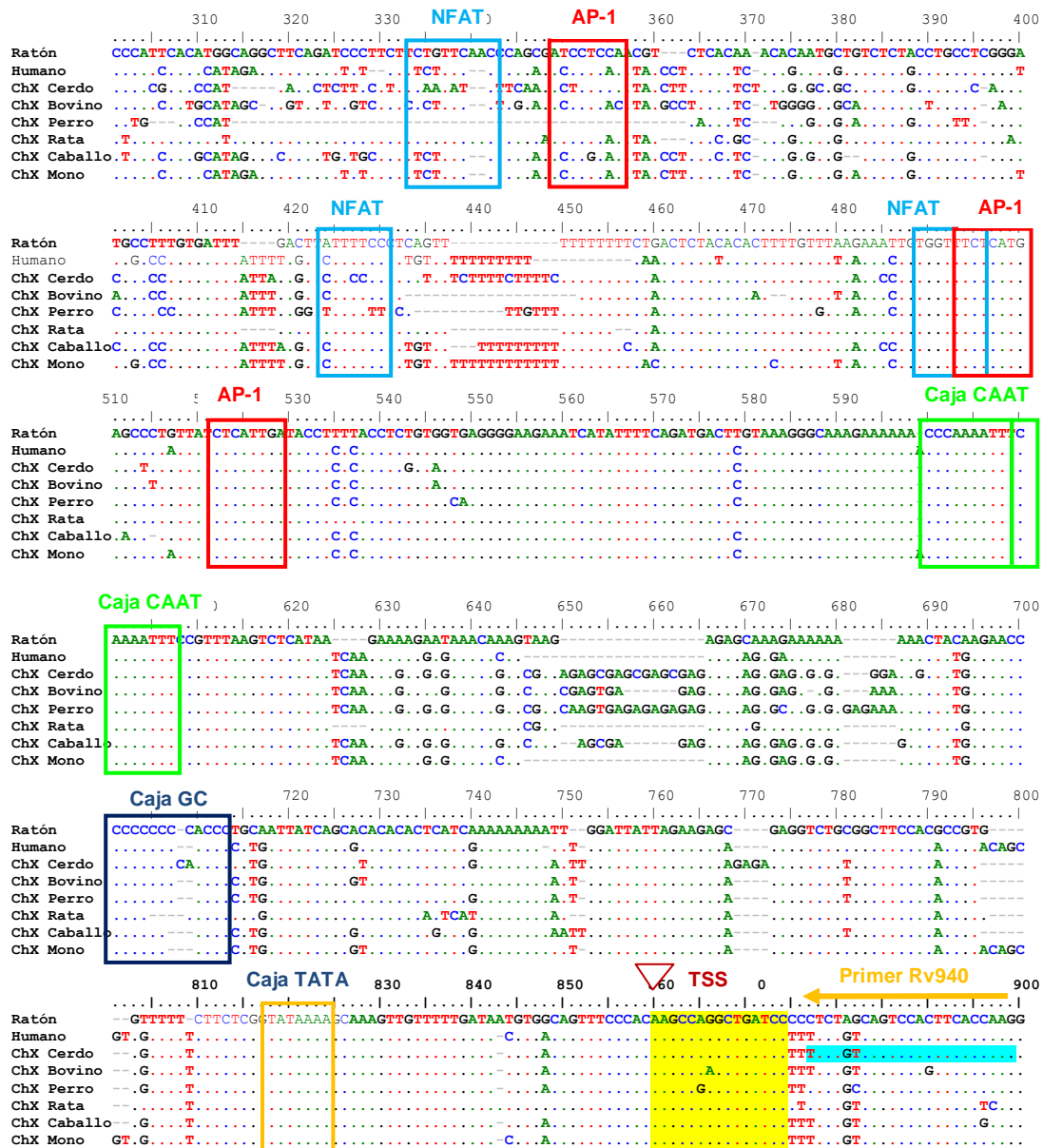


Figura 6. Identificación de la secuencia putativa del promotor central del *foxp3* de cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono identificadas en el cromosoma X de cada especie. Se encuentra identificado el sitio de inicio de la transcripción (TSS) (triángulo), las cajas TATA, GC y CAAT (recuadros) y los sitios de unión a los factores de transcripción NFAT, AP-1 y NF- $\kappa$ B (recuadros). Asimismo, se encuentran resaltados y señalados con flechas los primers diseñados para amplificar la región promotora central del *foxp3* de cerdo.

A partir del alineamiento de la Figura 6 se obtuvo el porcentaje de identidad entre nucleótidos del promotor central del *foxp3* de ratón, humano y las demás especies. La Tabla 1 muestra los porcentajes de identidad entre nucleótidos y se puede observar que la identidad de la secuencia del cerdo con respecto a la de humano es de 76.3 %, mientras que la de cerdo comparada con la de ratón es de 70.5 %. Asimismo, se observó que la secuencia del promotor central del *foxp3* porcino presenta una mayor identidad con la de caballo con 83.2 %, seguido por la de bovino con 80.4 %.

Tabla 1. Porcentaje de identidad a nivel de las secuencias de nucleótidos del potencial promotor central del *foxp3* de cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono en el cromosoma X de cada especie.

Seq-> (%)	Ratón	Humano	ChX Cerdo	ChX Bovino	ChX Perro	ChX Rata	ChX Caballo	ChX Mono
Ratón	ID	72.9	70.5	70.9	68.2	90.4	73.8	74.2
Humano		ID	76.3	77.6	72.4	72.8	82.5	94.7
ChX Cerdo			ID	80.4	76.2	70.5	83.2	78.7
ChX Bovino				ID	76.6	71.6	84.4	79.6
ChX Perro					ID	67.9	78.1	74.2
ChX Rata						ID	74.7	73.9
ChX Caballo							ID	85.0
ChX Mono								ID

Con base a la localización de la región del promotor central del *foxp3* en el cromosoma X de cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono se determinó que el sitio de inicio de la transcripción se encuentra a -8040 pb del sitio de inicio de la

traducción en el cerdo, en el bovino a -6646 pb, en el perro a -6751 pb, en la rata a -6653 pb, en el caballo a -6609 pb y en el mono a -6196 pb.

Según Eckerstorfer et al., 2010, la región entre -400 a -500 pb del TSS del gen *foxp3* de ratón y humano presenta 85 % de identidad. Debido a esto, se realizó un análisis adicional con 450 pb corriente arriba del TSS, de la secuencia del promotor del *foxp3* de ratón, humano, la secuencia putativa de cerdo y las demás especies (Figura 7). Se establecieron los porcentajes de identidad para este alineamiento (Tabla 2) y se encontró que en el caso del ratón presenta un porcentaje de identidad de 82.6 % con respecto al cerdo, el de humano tiene un 86.5 %, el de bovino un 92.1 %, el de perro un 92.6 %, el de rata un 83.6 %, el de caballo un 92.5 % y el de mono un 87.2 %.

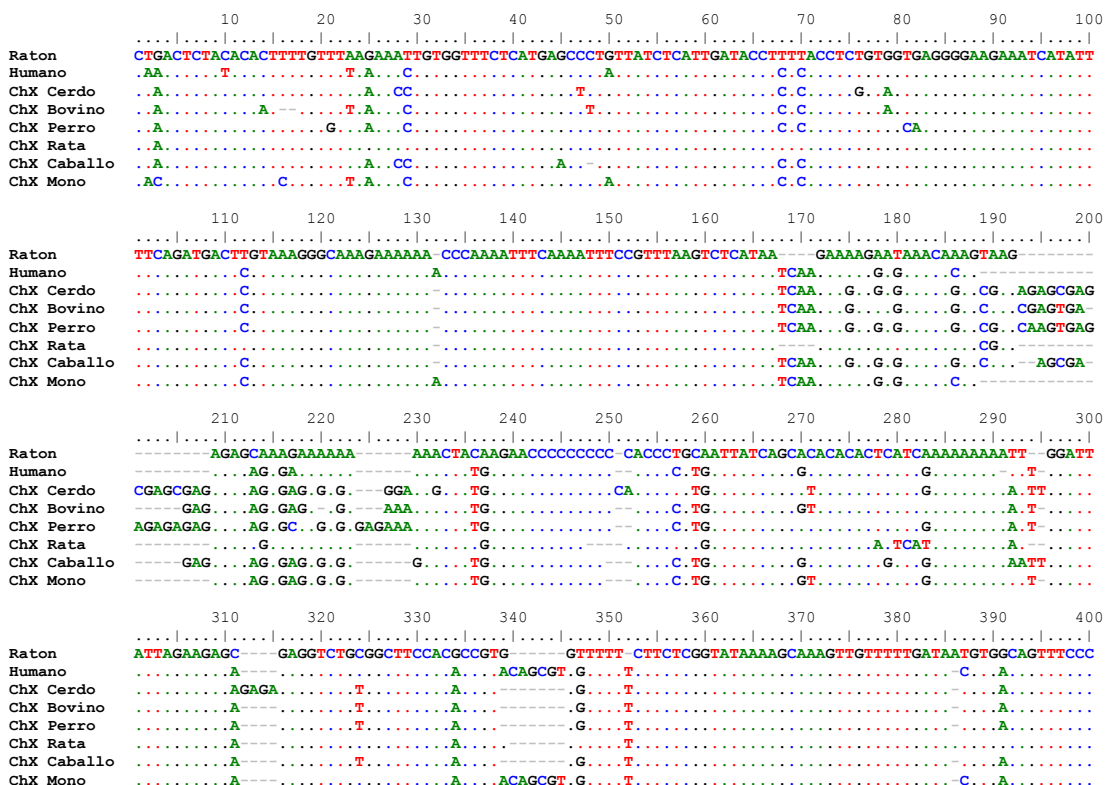


Figura 7. Continúa

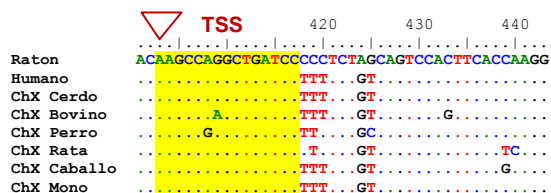


Figura 7. Alineamiento que incluye 450 pb corriente arriba del TSS del promotor central del *foxp3* de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino, ChX de perro, ChX de rata, ChX de caballo y ChX de mono

Tabla 2. Identities nucleotídicas (%) resultado del alineamiento que incluye 450 pb corriente arriba del TSS del promotor del *foxp3* de ratón, humano, cerdo, bovino, perro, rata, caballo y mono.

Seq-> %	Raton	Humano	Cerdo	Bovino	Perro	Rata	Caballo	Mono
<b>Raton</b>	ID	86.7	82.6	84.5	83.9	94.2	85.1	85.7
<b>Humano</b>		ID	86.5	88.9	87.5	86.7	90.0	97.7
<b>Cerdo</b>			ID	92.1	92.6	83.6	92.5	87.2
<b>Bovino</b>				ID	92.5	84.7	93.7	89.6
<b>Perro</b>					ID	84.6	92.0	87.3
<b>Rata</b>						ID	86.2	85.9
<b>Caballo</b>							ID	90.7
<b>Mono</b>								ID

### Amplificación del promotor central del *foxp3* de cerdo

A partir del ADN extraído de timo y células T CD4<sup>+</sup> de cerdo, se amplificó un fragmento de aproximadamente 850 pb mediante PCR convencional (Figura 8).



El producto amplificado se purificó, se secuenció y se obtuvo una secuencia parcial de 486 pb. En la Figura 9, se muestra el resultado del alineamiento entre la secuencia del promotor central del *foxp3* de ratón, humano, la secuencia del cromosoma X de cerdo y bovino, y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado del cerdo. Se puede observar que la secuencia parcial del cerdo, corresponde a la secuencia identificada como el posible promotor central del *foxp3* del cromosoma X del cerdo, ya que se encontró un 95 % de identidad nucleotídica entre éstas.

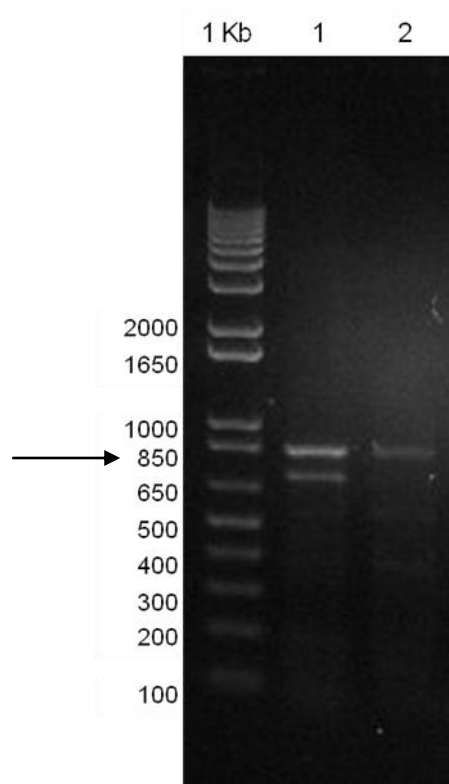


Figura 8. Amplificación de la región que contiene el potencial promotor central del *foxp3* de cerdo. Productos obtenidos durante la reacción de amplificación a partir de ADN de timo y linfocitos T CD4<sup>+</sup> de cerdo en los carriles 1 y 2, respectivamente.



Figura 9. Alineamiento de nucleótidos de la secuencia del promotor central del *foxp3* de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado (pFoxp3).

Tabla 3. Identidades nucleotídicas (%) resultado del alineamiento de la secuencia del promotor central del *foxp3* de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado (pFoxp3).

Seq-> %	Ratón	Humano	ChX Cerdo	Ch Bovino	pFoxp3
Ratón	ID	676.5	64.8	63.5	61.8
Humano		ID	72.7	72.8	68.4
ChX Cerdo			ID	72.8	95.0
ChX Bovino				ID	68.7
pFoxp3					ID

## Clonación del producto amplificado

Una vez identificada la secuencia amplificada de 850 pb del timo del cerdo, el producto se clonó inicialmente en el vector pCR 2.1-TOPO para obtener el vector pCR 2.1-TOPO-pFxp3. A partir del ADN plasmídico aislado mediante minipreps de 6 colonias, se realizó un PCR utilizando los iniciadores Fw90 y Rv940. Para esta amplificación se utilizaron las condiciones térmicas anteriormente mencionadas. Con lo anterior se verificó que el producto de 850 pb estuviera clonado en el vector pCR 2.1-TOPO (Figura 10).

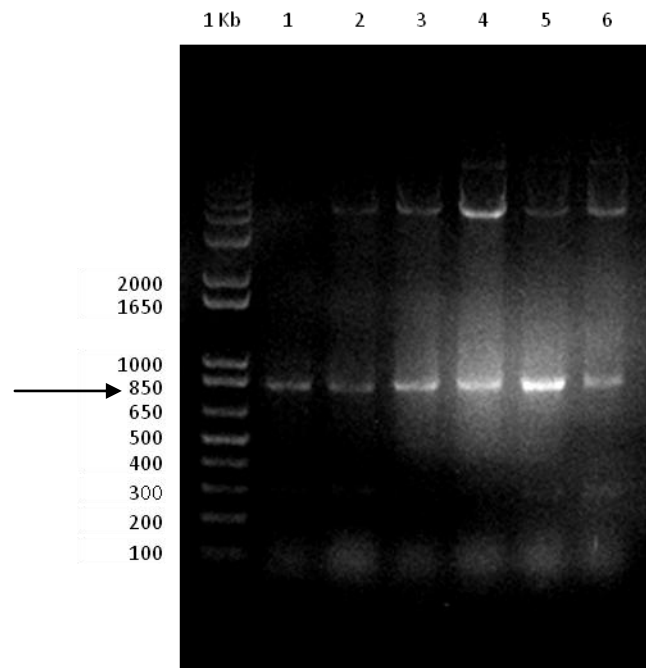


Figura 10. Productos amplificados obtenidos a partir del vector pCR 2.1-TOPO-pFxp3. Los productos obtenidos de las reacciones de amplificación realizadas a partir del plásmido recuperado de los minipreps de las colonias 1-6.

El producto de PCR de 850 pb amplificado a partir del plásmido pCR 2.1-TOPO-pFoxp3, se clonó en el vector pGL4.12 para obtener el vector pGL4.12-pFoxp3. Después de 24 horas de incubación a 37 °C de la transformación de células de *E. coli* con el plásmido pGL4.12-pFoxp3, se observó el crecimiento de 10 colonias. Se realizó una PCR de colonias utilizando los iniciadores Fw90 y Rv940. En la Figura 11 A se muestra el gel con los productos amplificados obtenidos de la PCR de dichas colonias. De todas las colonias excepto la número 2, se observó una banda de tamaño esperado (850 pb). Sin embargo, de las colonias 5, 6, 8, 9 y 10 se observó una banda con mayor intensidad (Figura 11 A).

A partir del PCR de colonias se encontró que 9 de éstas amplificaron un fragmento de aproximadamente 850 pb, las cuales se sembraron en medio LB/Ampicilina líquido. Se realizaron minipreps de las colonias que crecieron y con el ADN plasmídico recuperado se realizó una PCR con los iniciadores Fw90 y Rv940. En la Figura 11 B se muestra el gel con los productos amplificados de PCR y se observa que las colonias 5, 6, 8 y 9 presentaron una banda de tamaño esperado (850 pb). El ADN plasmídico recuperado de la colonia 8 se purificó, se secuenció y se obtuvo una secuencia parcial de 798 pb (Figura 12).

La secuencia obtenida del producto amplificado a partir del ADN plasmídico de la colonia número 8 se incluyó en el alineamiento con las secuencias del promotor central del *foxp3* de ratón y humano, así como las de cerdo y bovino identificadas a partir de la secuencia del cromosoma X. En dicho alineamiento (Figura 12) se puede localizar el sitio de inicio de la transcripción (TSS), las cajas TATA, GC y CAAT, así como los sitios de unión a factores de transcripción característicos del promotor central del *foxp3*.

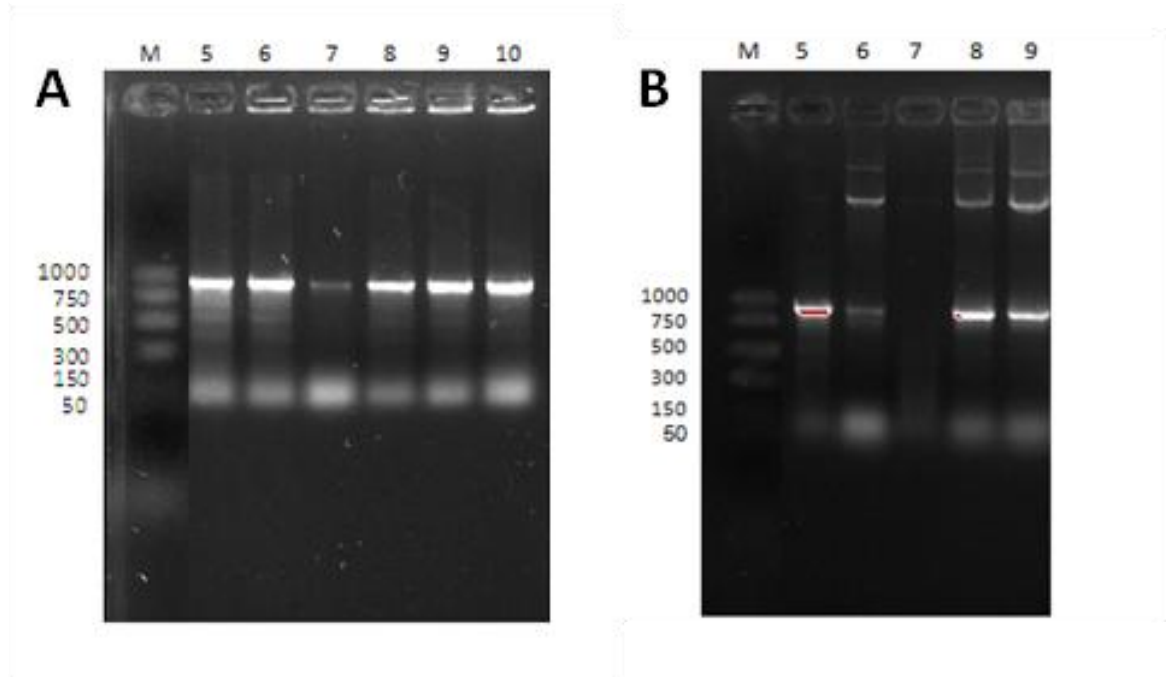


Figura 11. Amplificación del pFoxp3 de colonias transformadas y del plásmido pGL4.12 clonado con el pFoxp3. A) Productos amplificados obtenidos de las colonias transformadas con el vector pGL4.12-pFoxp3 (Colonias 5-10). B) Productos amplificados a partir de ADN plasmídico recuperado de colonias transformadas con el vector pGL4.12-pFoxp3.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Ratón      TGTGAATTT-----GTGGGGGAGTACAGCCAC-TTTTTCTCCATGAATGCTTTCCATGCCTCTGCCTCTGTGGAAAGAAAGGCTACAGGAGT
Humano     CA.....TA-GGGGA-.ACA.T.GG.TCT..G.-...C.C.....G.AAC..A.....C..CA..C.....GG..GGG.T.G...G.-
ChX Cerdo  A.C.GGGGAGGTGGG..T...AG.G..CC..TG.T.....C.....G.AAC.....C..AG.C.....AG...TG..T.G..ACC..
ChX Bovino .....GTGGGGG..A...AG.G..TC..TG.A.....GG.A...AAC...T.....C..CAGTC-----AG...TG..T.G..A..A.
pGL4-pFoxp3 A...C.CGGGGGTGG..-...AG.A-CC..TG.T.....C.....G.AAC...-CC.T...AG.C.....AG...TG..T.G..ACC..

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Ratón      GGCCAGCTCTGCCAAGCCTTGG-CAACATGATGG-TGGTGATCATATGCATGCTGCTAAGGAAATACTGAGGTTTGGAGCAGAAG-GAAGCCTCTGGAG
Humano     .TG...AA..C..C.T.GCC..GT.GTCA.GCAA...G..C.....CA..T.CAT...TA.GG.A.....CC.....T..G..C..G.....GA
ChX Cerdo  .T...GG..C..C.T..C...GT.GT.AA.AT.-.A...C.TC..CA..T.CCC...T..GG.A.....CC.....C.....CA.....CA...A
ChX Bovino .T...AG..C.TC.T...G..GT.A..GC.-.A...C..G.CAG.T.CACT...GT.A...-CC...C..C.-CA.G.....A
pGL4-pFoxp3 .T...GG..C..C.T..C...GT.GT.AA.AT.-.A...C.TC..CA..T.CCC...T..GG.A.....CC.....C.....CA.....CA...A

```

Figura 12. Continúa

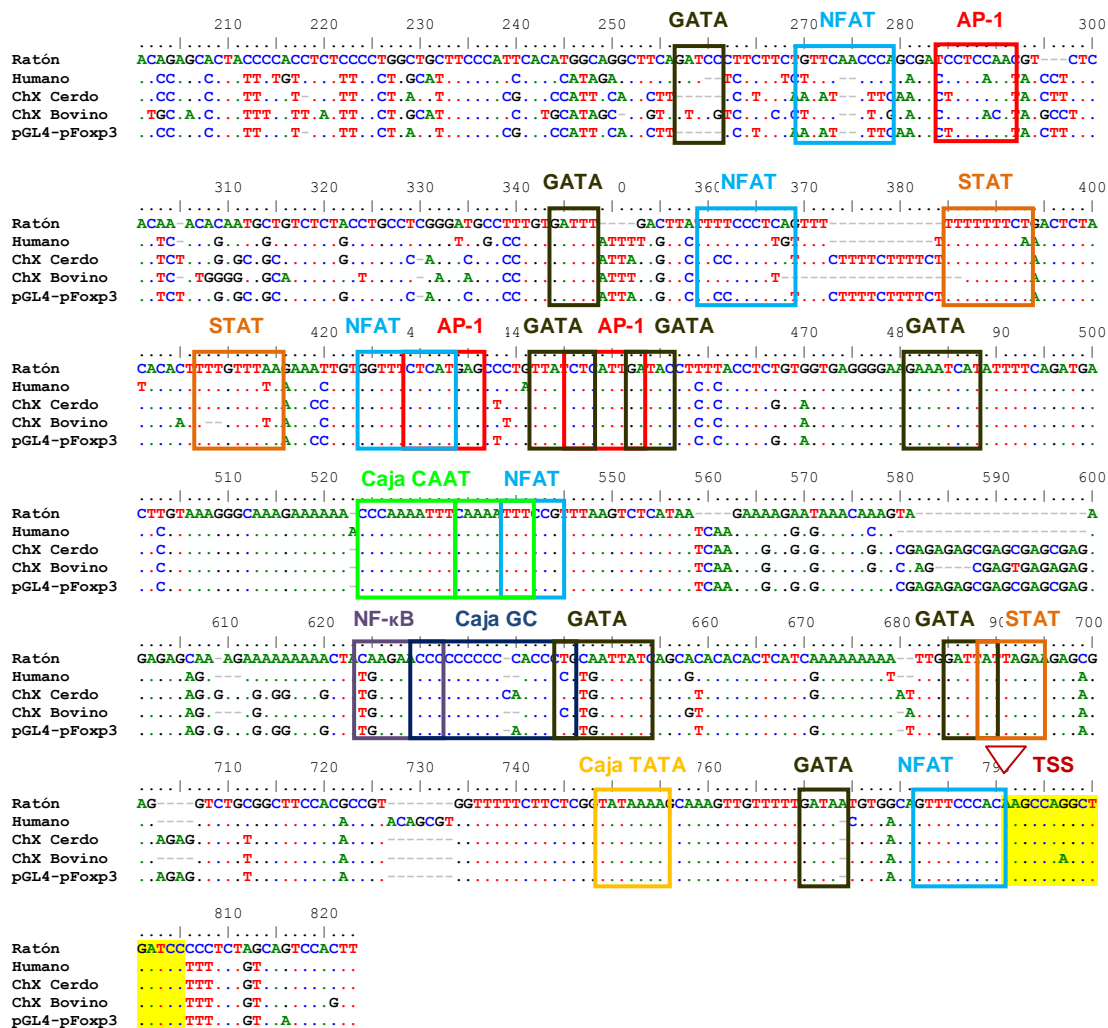


Figura 12. Alineamiento de la secuencia del promotor central del *foxp3* de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado del vector pGL4.12-pF<sub>oxp3</sub>. Se localizó el sitio de inicio de la transcripción (TSS) (indicado con un triángulo), las cajas TATA, GC y CAAT (señaladas con recuadros), así como los sitios de unión a factores de transcripción (indicados con recuadros) característicos del promotor central del *foxp3*.

Tabla 4. Identidad nucleotídica (%) resultado del alineamiento de la secuencia del promotor central del *foxp3* de ratón, humano, ChX de cerdo, ChX de bovino y la secuencia parcial obtenida del producto amplificado del vector pGL4.12-pFoxp3.

Seq-> %	Ratón	Humano	ChX Cerdo	ChX Bovino	pGL4-pFoxp3
<b>Ratón</b>	ID	74.9	71.3	71.7	71.1
<b>Humano</b>		ID	77.3	79.8	76.9
<b>ChX Cerdo</b>			ID	80.2	97.5
<b>ChX Bovino</b>				ID	79.5
<b>pGL4-pFoxp3</b>					ID

Como se observa en la Tabla 4, la secuencia del producto clonado en el vector pGL4.12 presenta un 97.5 % de identidad con la secuencia del cromosoma X de cerdo identificada como promotor central del *foxp3*.

### **Transfección del vector pGL4.12-pFoxp3 y ensayos de activación del promotor por luminiscencia**

Los resultados observados de la transfección de células HEK293 con el constructo pGL4.12-pFoxp3 y ensayos de actividad de luciferasa se muestran en la Tabla 5. Se puede observar que el resultado obtenido del vector pGL4.12 es valor de luminiscencia de fondo, mientras que el valor del vector pGL4.12-pFoxp3 es resultado de la actividad basal del promotor sin estimular. Cuando el vector pGL4-pFoxp3 fue incubado con 5 ng/mL de TGF- $\beta$  se observó un incremento en la actividad de luciferasa de 5.7 veces con respecto al vector

pGL4.12-pFoxp3 (sin TGF- $\beta$ ). Lo anterior sugiere que el TGF- $\beta$  incrementa la actividad del promotor del *foxp3* de cerdo y que podría estar induciendo la expresión de este gen.

Tabla 5. Plásmidos transfectados y unidades de luminiscencia obtenidas con cada uno de ellos.

<b>Tratamientos</b>	<b>Unidades de Luminiscencia, LU</b>
pGL4.12	25
pGL4.12-pFoxp3	65
pGL4.12-pFoxp3 + TGF- $\beta$ (5 ng/mL)	371
pGL3-Control	2403



## DISCUSIÓN

El *foxp3* es un gen denominado “regulador maestro” en los Tregs, ya que es esencial para la diferenciación y la función de estas células. Hasta el momento se conoce la secuencia del promotor del *foxp3* de algunas especies, entre ellas la de humano y ratón. Sin embargo, no existe ningún estudio sobre la caracterización y función del promotor del *foxp3* de cerdo.

Debido a la importancia que tiene el *foxp3* en las células T reguladoras, se ha hecho un gran esfuerzo por conocer las vías de señalización y los factores que inducen la expresión de este gen. En el humano y el ratón, se tiene ventaja sobre estos temas, pero aún existen muchas lagunas al respecto. No obstante, en cerdo se desconocen por completo.

En este estudio se describe la localización del promotor central del *foxp3* de cerdo en el cromosoma X. En humano, la región no traducida (UTR) en 5' del *foxp3* se encuentra interrumpida por un intrón de 6000 pb y en el caso de ratón de 6667 pb (Mantel et al., 2006). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el sitio de inicio de la transcripción en el cerdo se encuentra a -8040 pb del sitio de inicio de la traducción, en el bovino a -6646 pb, en el perro a -6751 pb, en la rata a -6653 pb, en el caballo a -6609 pb y en el mono a -6196 pb.

De acuerdo a lo reportado por Eckerstorfer et al., 2010, el promotor del *foxp3* de humano presenta 3 regiones evolutivamente conservadas (ECR) ya que presentan aproximadamente 85 % de identidad entre las especies humano y ratón. La ECR3 se encuentra entre la posición -5000 a -6000 pb con respecto al TSS. La ECR2 se encuentra entre -1300 y -2000 pb con respecto al TSS. La ECR1 se encuentra entre -400 y -500 pb del sitio de inicio de la transcripción.

Lo anterior concuerda con nuestros resultados, ya que en un alineamiento de todas las secuencias analizadas tomando en cuenta solo 450 pb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción (Figura 7), el porcentaje de identidad con respecto a la secuencia del cerdo va del 82.6 al 92.6 % entre todas las especies analizadas (Tabla 2).

Como se observa en la Figura 7, las primeras 500 pb de la región del promotor central del *foxp3* presentan un elevado grado de identidad en todas las especies analizadas. Esto sugiere que dicha región es muy importante en la regulación de la expresión del gen *foxp3* y que el mecanismo de regulación es muy similar en estas especies. Asimismo indica que la secuencia de esta región se ha mantenido a lo largo del proceso evolutivo en estos organismos.

Para investigar más a fondo la funcionalidad del promotor central del *foxp3* que se encuentra dentro de los primeros 500 pb, se buscaron los sitios de unión característicos de los promotores eucarióticos. Se identificaron varias características comunes de los promotores principales eucariotas, tales como las cajas TATA, GC, y las cajas CAAT. La caja TATA (TATAAAA) en la secuencia del cerdo, se encuentra 41 pb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción. En el ratón la caja TATA se encuentra a -42 pb y en el humano a -44 pb del TSS (Mantel et al., 2006). Esta secuencia se conserva entre humanos, ratón, bovino, perro, rata, caballo y mono (Figura 6). Debido a que la caja TATA es una característica importante de los promotores de eucariotas y se encuentra generalmente 30 a 25 pb corriente arriba del TSS (Benoist y Chambon, 1981), se identificó en todas las secuencias analizadas.

La caja GC es otro elemento básico de los promotores eucariotas, que en la secuencia del cerdo se encuentra a 151 pb corriente arriba del TSS. En el ratón esta secuencia se encuentra a -158 pb y en el humano a -138 pb del TSS

(Mantel et al., 2006). De igual forma se identificó esta caja en todas las secuencias analizadas (Figura 6).

Finalmente, se identificó la caja CAAT en la secuencia del cerdo, la cual se encuentra 257 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. En el caso del ratón se encuentra a -230 pb y en el humano a -218 pb del TSS (Mantel et al., 2006).

Al igual que en el promotor de *foxp3* de humano y ratón, el de cerdo presenta sitios de unión a los factores de transcripción NFAT, AP-1 (Mantel et al., 2006), NF- $\kappa$ B (Eckerstofer et al., 2010), GATA y STAT (Ouaked et al., 2009). Estos sitios se encuentran identificados en el alineamiento de la Figura 12.

A partir de los resultados preliminares de los ensayos de actividad de luciferasa que se muestran en la Tabla 5, se puede decir que la región obtenida es una región promotora del *foxp3* de cerdo y que el TGF- $\beta$  es capaz de activarla. Sin embargo, éste resultado debe tomarse con cautela debido a que es parte de un experimento preliminar.

La activación del promotor del *foxp3* de cerdo inducido por el TGF- $\beta$  podría resultar del reconocimiento de esta citocina a través de su receptor celular, y así promover una cascada de señalización dependiente de SMAD para inducir la expresión del *foxp3*. Como se menciona en un estudio, los factores de transcripción SMAD3, NF- $\kappa$ B, NFATc2 y CREB son capaces de formar un complejo potenciador que se une al promotor del *foxp3* (Tone et al., 2007). SMAD3 podría interactuar indirectamente con el promotor del *foxp3* a través de la unión de los otros componentes del complejo potenciador como NF- $\kappa$ B, NFATc2 y CREB. Lo anterior es factible ya que la secuencia obtenida del promotor del *foxp3* de cerdo presenta sitios de unión a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y NFAT.

Para pulir este trabajo sería necesario realizar experimentos de activación del promotor por triplicado para comprobar los resultados obtenidos, así como normalizar los valores de Luciferasa de luciérnaga con los de Luciferasa de Renilla. Lo anterior para minimizar la variabilidad experimental causada por las diferencias en la viabilidad de las células, la eficiencia de transfección, diferencias en el pipeteo, en la eficiencia de la lisis celular, etc. Se podrían inducir mutaciones en las cajas TATA, GC y CAAT, así como en los sitios de unión a diferentes factores de transcripción para corroborar que la secuencia clonada en el vector pGL4.12 corresponde a una región reguladora. Asimismo, se podrían hacer cotransfecciones del vector pGL4.12-pFoxp3 con un plásmido que tuviera la secuencia codificante de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, NFAT, AP-1, GATA, STAT 5, etc. Esto último para conocer el efecto de cada uno de ellos en la actividad del promotor del *foxp3* de cerdo.

## CONCLUSIONES

Por análisis de alineamiento se identificó la secuencia de una potencial región promotora del gen *foxp3* de cerdo.

El posible promotor central del gen *foxp3* de cerdo se amplificó y clonó en el vector pGL4.12 que expresa una luciferasa como gen reportero y se obtuvo el plásmido pGL4.12-pFoxp3.

En un ensayo preliminar en células HEK293 se observó que el TGF- $\beta$  estimula la actividad del promotor pFoxp3 más de 5 veces. Este resultado sugiere que el TGF- $\beta$  podría estar induciendo la expresión de este gen.

## REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S., 2008, *Inmunología celular y molecular*, 6<sup>o</sup> Edition. Elsevier, Madrid, España.
- Apostolou, I., Verginis, P., Kretschmer, K., Polansky, J., Huhn, J., von Boehmer, H., 2008, Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance. *Journal of clinical immunology* 28, 619-624.
- Benoist, C., Chambon, P., 1981, In vivo sequence requirements of the SV40 early promotor region. *Nature* 290, 304-310.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.
- Birnboim, H.C., Doly, J., 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F., 2000, Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England journal of medicine* 342, 1350-1358.
- Bolzer, K., Käser, T., Saalmüller, A., Hammer, S.E., 2009, Molecular characterisation of porcine Forkhead-box p3 (Foxp3). *Vet Immunol Immunopathol* 132, 275-281.
- Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paepfer, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F., Ramsdell, F., 2001, Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* 27, 68-73.

- Bucknera, J., Zieglerb, S., 2008, Functional analysis of FOXP3. *Ann N Y Acad Sci*, 151-169.
- Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., Ley, T.J., 2007, Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27, 635-646.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003, Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198, 1875-1886.
- Chen, W., Wahl, S.M., 1999, Manipulation of TGF-beta to control autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1, 1367-1380.
- Chen, W., Wahl, S.M., 2002, TGF-beta: receptors, signaling pathways and autoimmunity. *Current directions in autoimmunity* 5, 62-91.
- Chen, W., Wahl, S.M., 2003, TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine & growth factor reviews* 14, 85-89.
- Corthay, A., 2009, How do Regulatory T Cells Work? *Scand J Immunol* 70, 326-336.
- da Cunha, A., Vitkovic, L., 1992, Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression and regulation in rat cortical astrocytes. *Journal of neuroimmunology* 36, 157-169.
- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., Shevach, E.M., 2007, Cutting edge: IL-2 is essential for TGF- $\beta$ -mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178, 4022.
- Denning, T.L., Wang, Y.-c., Patel, S., Williams, I., Pulendran, B., 2007, Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8, 1086-1094.

- Derynck, R., Zhang, Y.E., 2003, Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Eckerstorfer, P., Novy, M., Burgstaller-Muehlbacher, S., Paster, W., Schiller, H.B., Mayer, H., Stockinger, H., 2010, Proximal human FOXP3 promoter transactivated by NF-kappaB and negatively controlled by feedback loop and SP3. *Molecular immunology* 47, 2094-2102.
- Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R., Neurath, M.F., 2004, Cutting edge: TGF- induces a regulatory phenotype in CD4+ CD25-T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172, 5149.
- Fontenot, J., Gavin, M., Rudensky, A., 2003, Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330-336.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., Dooley, J.L., Farr, A.G., Rudensky, A.Y., 2005, Regulatory T Cell Lineage Specification by the Forkhead Transcription Factor Foxp3 *Immunity* 22, 329-341.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y., Bromberg, J.S., 2004, TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant* 4, 1614-1627.
- Gambineri, E., Torgerson, T., Ochs, H., 2003, Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15, 430-435.
- Gershon, R.K., Kondo, K., 1970, Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723-737.
- Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., Noelle, R.J., 2005, Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174, 1783-1786.



- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S., 2003a, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057.
- Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S., 2003b, Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *Advances in immunology* 81, 331-371.
- Huehn, J., Polansky, J., Hamann, A., 2009, Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nat Rev Immunol* 9, 83-89.
- Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmuller, A., 2008, Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 125, 92-101.
- Kaser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmüller, A., 2007, Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> regulatory T cells. *Veterinary immunology and immunopathology* 122, 153-158.
- Kaser, T., Gerner, W., Saalmuller, A., 2011, Porcine regulatory T cells: Mechanisms and T-cell targets of suppression. *Developmental and comparative immunology*.
- Kasprovicz, D., Droin, N., Soper, D.M., Ramsdell, F., Green, D.R., Ziegler, S.F., 2005, Dynamic regulation of FoxP3 expression controls the balance between CD4<sup>+</sup> T cell activation and cell death. *Eur J Immunol* 35, 3424-3432.
- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.-A., Ramsdell, F., 2003a, An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F., 2003b, An essential role for Scurfin in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
- Lankford, S., Petty, C., LaVoy, A., Reckling, S., Tompkins, W., Dean, G.A., 2008, Cloning of feline FOXP3 and detection of expression in

- CD4+CD25+ regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 122, 159-166.
- Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A.B., Perruche, S., Chen, W., 2008, A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 9, 632-640.
- Luo, X., Tarbell, K.V., Yang, H., Pothoven, K., Bailey, S.L., Ding, R., Steinman, R.M., Suthanthiran, M., 2007, Dendritic cells with TGF- 1 differentiate naive CD4+ CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. *Natl Acad Sci* 104, 2821.
- Lyons, R.M., Moses, H.L., 1990, Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *European journal of biochemistry / FEBS* 187, 467-473.
- Mantel, P.Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B.N., Hendriks, R.W., Cramer, R., Akdis, C.A., Blaser, K., Schmidt-Weber, C.B., 2007, GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS biology* 5, e329.
- Mantel, P.Y., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Welz, R., Blaser, K., Schmidt-Weber, C.B., 2006, Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176, 3593-3602.
- Marie, J., Letterio, J., Gavin, M., Rudensky, A., 2005, TGF-β1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201, 1061-1067.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., Cheroutre, H., 2007, Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317, 256-260.
- Nakamura, K., Kitani, A., Strober, W., 2001, Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by

- cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194, 629-644.
- Ouaked, N., Mantel, P.Y., Bassin, C., Burgler, S., Siegmund, K., Akdis, C.A., Schmidt-Weber, C.B., 2009, Regulation of the *foxp3* gene by the Th1 cytokines: the role of IL-27-induced STAT1. *J Immunol* 182, 1041-1049.
- Perruche, S., Zhang, P., Liu, Y., Saas, P., Bluestone, J.A., Chen, W., 2008, CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med* 14, 528-535.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M., 1995, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Silva-Campa, E., Flores-Mendoza, L., Resendiz, M., Pinelli-Saavedra, A., Mata-Haro, V., Mwangi, W., Hernandez, J., 2009, Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387, 373-379.
- Sojka, D.K., Huang, Y.H., Fowell, D.J., 2008, Mechanisms of regulatory T cell suppression—a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124, 13-22.
- Steigerwalt, R.W., Rundhaug, J.E., Nettesheim, P., 1992, Transformed rat tracheal epithelial cells exhibit alterations in transforming growth factor-beta secretion and responsiveness. *Molecular carcinogenesis* 5, 32-40.
- Su, L., Creusot, R., Gallo, E., Chan, S., Utz, P., Fathman, G., Ermann, J., 2004, Murine CD4+CD25+ regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J Immunol* 173, 4994-5001.
- Tang, Q., Bluestone, J.A., 2008, The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9, 239-244.

- Tang, Q., Henriksen, K., Bi, M., Finger, E., Szot, G., Ye, J., Masteller, E., McDevitt, H., Bonyhadi, M., Bluestone, J., 2004, In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199, 1455-1465.
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., Tone, M., 2007, Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 9, 194-202.
- Vieira, P., Christensen, J., Minaee, S., O'Neill, E., Barrat, F.J., Boonstra, A., Barthlott, T., Stockinger, B., Wraith, D., O'Garra, A., 2004, IL-10-Secreting Regulatory T Cells Do Not Express Foxp3 but Have Comparable Regulatory Function to Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells *J Immunol* 172, 5986-5993.
- Wan, Y.Y., Flavell, R.A., 2005, Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5126-5131.
- Weiner, H., 2001, Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*, 207-214.
- Workman, C., Szymczak-Workman, A., Collison, L., Pillai, M., Vignali, D., 2009, The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci* 66, 2603–2622
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L., Rao, A., 2006, FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126, 375-387.
- Zheng, S.G., Wang, J., Wang, P., Gray, J.D., Horwitz, D.A., 2007, IL-2 is essential for TGF- to convert naive CD4+ CD25–cells to CD25+ Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* 178, 2018.
- Zhou, L., Lopes, J.E., Chong, M.M., Ivanov, II, Min, R., Vitorica, G.D., Shen, Y., Du, J., Rubtsov, Y.P., Rudensky, A.Y., Ziegler, S.F., Littman, D.R., 2008,

TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 453, 236-240.

Zhu, J., Paul, W., 2008, CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569.