

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 185**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2010 E 12166847 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2503334**

54 Título: **Identificación de linfocitos T reguladores mediante el regulador del gen global SatB1**

30 Prioridad:

02.04.2009 US 165970 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.04.2015

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (50.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US y
RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHULTZE, JOACHIM LUDWIG;
BEYER, MARC DANIEL;
WARNER, NOEL y
BALDERAS, ROBERT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 533 185 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Identificación de linfocitos T reguladores mediante el regulador del gen global SatB1

La presente invención proporciona un procedimiento para la identificación de linfocitos T reguladores inestables basándose en los elevados niveles del regulador del gen global SATB1 en linfocitos T reguladores. La invención también se refiere a un procedimiento que utiliza ligandos que se unen específicamente a SATB1 para identificar linfocitos T reguladores inestables.

Antecedentes de la invención

Los linfocitos T reguladores (T_{reg}) están implicados en la auto-tolerancia, homeostasis inmunitaria, prevención de la autoinmunidad y supresión de la inmunidad a patógenos o tumores (Sakaguchi, S. y col., *Cell* 133:775-787 (2008); Balkaid, Y., *Nat. Rev. Immunol* 7:875-888 (2007); Beyer, M., Schultze, J., *Blood* 1008:804-811 (2006)). El factor de transcripción de forkhead FOXP3 es esencial para el desarrollo y la función de T_{reg} ya que las mutaciones en FOXP3 producen grave autoinmunidad en ratones y seres humanos (Hori, S. y col., *Science* 299:1057-1061 (2003); Fontenot, J.D y col., *Nat. Immunol.* 4:330-336 (2003); Khattri, R. y col., *Nat. Immunol.* 4:337-342 (2003); Brunkow, M.E. y col., *Nat. Genet.* 27:68-73 (2001); Bennett, C.L. y col., *Nat. Genet.* 27:20-21 (2001); Wildin, R.S. y col., *Nat. Genet.* 27:18-20 (2001)). FOXP3 previene el compromiso del linaje de linfocitos T efectoros ($T_{efector}$) (Zhou, L. y col., *Nature* 453:236-240 (2008)), además, los mecanismos moleculares subyacentes son todavía imprecisos.

Los T_{reg} se caracterizan por su función supresora e incapacidad para producir citocinas. Se requiere la expresión de FOXP3 para el establecimiento y mantenimiento del linaje, identidad y función supresora de T_{reg} (Hori, S. y col., *Science* 299:1057-1061 (2003); Fontenot, J.D y col., *Nat. Immunol.* 4:330-336 (2003); Khattri, R. y col., *Nat. Immunol.* 4:337-342 (2003); Lin, W. y col., *Nat. Immunol.* 8:359-368 (2007); Wan, Y.Y., Flavell, R.A., *Nature* 445:766-770 (2007); Lahl, K. y col., *J. Immunol.* in press (2009); Williams, L. M., Rudensky, A.Y., *Nat. Immunol.* 8:277-284 (2007)). La pérdida de FOXP3 en T_{reg} se ha asociado a un fenotipo TH2 (Lin, W. y col., *Nat. Immunol.* 8:359-368 (2007); Wan, Y.Y., Flavell, R.A., *Nature* 445:766-770 (2007); Lahl, K. y col., *J. Immunol.* in press (2009)) respectivamente TH1 (Lin, W. y col., *Nat. Immunol.* 8:359-368 (2007)) o TH17 (Gavin, M.A. y col., *Nature* 445:771-775 (2007)) de T_{reg} que sugiere que FOXP3 suprime activamente la diferenciación de T_{reg} en $T_{efector}$. Un mecanismo de represión de la diferenciación de $T_{efector}$ por FOXP3 podría ser la modulación directa de factores de transcripción (Ziegler, S.F., *Annu. Rev. Immunol.* 24:209-226 (2006)), tales como el factor 4 regulador de interferón (IRF4), que es necesario para la supresión mediada por T_{reg} de la diferenciación de células efectoras TH2 (Zheng, Y. y col., *Nature* (2009)). Se ha sugerido el control epigenético por metilación de ADN o modificación de histonas como un mecanismo alternativo que sostiene el fenotipo y función de T_{reg} (Wei, G. y col., *Immunity* 30:155-167 (2009)). Estos hallazgos novedosos indican que hay un grado significativo de plasticidad entre linajes de $T_{efector}$ y T_{reg} y que los mecanismos reguladores activos deben permitir T_{reg} comprometidos para prevenir la diferenciación de $T_{efector}$. La presente invención proporciona novedosos genes marcadores para la identificación y caracterización específica de linfocitos T supresores humanos y/o reguladores que incluyen linfocitos T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ naturales, adaptativos y ampliados en individuos sanos, además de pacientes con tumor o pacientes con enfermedades autoinmunitarias.

Pfoertner y col. (*GenomeBiology* 2006, 7:R54) describe la firma genética de linfocitos T reguladores.

Breve descripción de la invención

Se ha encontrado ahora que la enzima remodeladora de cromatina SATB1 (SEC ID N°: 2) que se requiere para el desarrollo normal de linfocitos T tímicos (Alvarez, J.D. y col., *Genes Dev.* 14:521-535 (2000)), homeostasis de linfocitos T periféricos (Nie, H. y col., *J. Immunol.* 174:4745-4752 (2005)), polarización de TH1/TH2 (Cai, S. y col. *Nat. Genet.* 38:1278-1288 (2006); Lund, R. y col., *Eur. J. Immunol.* 35:3307-3319 (2005)) y reprogramación de la expresión génica (Han, H.J. y col., *Nature* 452:187-193 (2008)) es un gen diana importante de FOXP3. La expresión de SATB1 es significativamente reducida en T_{reg} de $FOXP3^+$ murinos y humanos naturales e inducidos. FOXP3 reduce la expresión de SATB1 directamente como un represor transcripcional en el sitio de SATB1 e indirectamente mediante la inducción de microARN miR-155, miR-21, miR-7, miR-34 y miR-18a, uniéndose específicamente a la 3'UTR del ARNm de SATB1. La expresión reducida de SATB1 en células $FOXP3^+$ alcanzada tanto por la expresión en exceso como la inducción de FOXP3 está ligada a la reducción significativa en citocinas TH1 y TH2. La pérdida de función de FOXP3 tanto por inactivación como mutación genética conduce a una regulación por incremento significativa de SATB1 y la posterior liberación de citocinas. Como el sitio de SATB1 está similarmente desmetilado en T_{reg} y $T_{efector}$, el compromiso del linaje de T_{reg} requiere la inhibición activa y continua mediada por FOXP3 de SATB1, prohibiendo así la diferenciación de $T_{efector}$. Esto da importancia a la modulación específica de linfocitos T mediada por SATB1 de la remodelación de cromatina global durante el proceso de decisiones entre la función de linfocitos T efectoros y reguladores. Y, lo que es más importante, la expresión en exceso de SATB1 en linfocitos T_{reg} naturales humanos conduce a pérdida de función supresora y aumento de la función de $T_{efector}$ en linfocitos T_{reg} . Estos datos sugieren fuertemente que la inhibición de la modulación específica de linfocitos T mediada por SATB1 de la remodelación de cromatina global es centralmente

importante para el control de plasticidad funcional en linfocitos T_{reg}. Así, la invención proporciona

1. Un procedimiento de detección de linfocitos T reguladores inestables en una población de linfocitos T reguladores que tienen el potencial de convertir en funcionalidad de linfocitos T efectores, procedimiento que comprende detectar células con niveles elevados de expresión de proteínas SATB1 en la población de linfocitos T.
2. El procedimiento de la cláusula 1, en el que las células con niveles elevados de expresión de proteínas SATB1 en la población de linfocitos T se detectan mediante un procedimiento que comprende
 - (a) poner en contacto la población de células con uno o más ligandos que se unen específicamente a SATB1, y
 - (b) identificar los linfocitos T reguladores en la población de células debido a una reducción significativa de la unión con los ligandos de unión a SATB1 en comparación con la unión de dichos ligandos con las otras células en la población de células.
3. El procedimiento de la cláusula 1 ó 2, que es adecuado para el control de calidad de poblaciones de linfocitos T reguladores.
4. El procedimiento de la cláusula 2, en el que los ligandos son anticuerpos o fragmentos de los mismos, preferentemente los ligandos son anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.
5. El procedimiento de la cláusula 2 ó 4, en el que los ligandos/anticuerpos llevan restos funcionales que incluyen, pero no se limitan a, marcas, colorantes y toxinas.
6. El procedimiento de la cláusula 2, 4 ó 5, en el que la población de células está seleccionada de cultivo celular, sangre completa y fracciones de sangre completa y/o la población de células comprende células de mamífero que incluyen células humanas.
7. El procedimiento de la cláusula 6, que comprende además poner en contacto la población de células humanas con uno o más ligandos que se unen específicamente a CD4, CD25 y/o CD127 sobre los linfocitos T.
8. El procedimiento de la cláusula 6 ó 7, que comprende además ensayar la expresión de FOXP3.
9. Uso del ligando, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la cláusula 2, 4 ó 5 para identificar linfocitos T reguladores inestables en una población de células.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: SATB1 se regula por disminución en linfocitos T reguladores naturales humanos. Se purificaron linfocitos T reguladores (T_{reg}) naturales CD4⁺CD25^{alto} CD127^{bajo} tanto por clasificación de FACS como de MACS (>95 % de pureza). Se usaron linfocitos T convencionales (T_{conv}) CD4⁺CD25⁻ para la comparación. Se estudiaron al menos 4 donantes y se representa la media +/- DE; * p < 0,05. **a:** Expresión de ARNm de SATB1 (rojo) y FOXP3 (azul) como se evalúa por el análisis de micromatrices en un total de 48 condiciones experimentales (3-4 duplicados cada uno, véase la Tabla 1). Las condiciones individuales se agrupan aquí según condición experimental (act=activación, rep=reposo, exp=expandidas) y linaje (T_{reg} CD4⁺CD25⁺ (T_{reg}) frente a linfocitos T CD4⁺CD25⁻ (CD25⁻) frente a linfocitos T CD4⁺ totales (T_{conv})). **b:** La correlación de la expresión de miARN con la expresión de ARNm de SATB1 se representa contra las veces de cambio de miARN (T_{reg} frente a T_{conv}) para los 735 miARN ensayados. Resaltado en rojo está miR-155. **c:** Expresión relativa de ARNm de SATB1 en T_{reg} y T_{conv} evaluados por qRT-PCR (media +/- DE, se realizaron 6 experimentos individuales). **d:** Análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas SATB1 en un donante representativo (izquierda) y expresión relativa de SATB1 (n=3, media +/- SD, derecha). **e:** Tinción intracelular para SATB1 en un experimento representativo (izquierda) y expresión media de SATB1 +/- DE en T_{reg} y T_{conv} (n=11, derecha). **f:** Influencia en la activación de TCR, coestimulación y estimulación de TGFβ sobre la expresión de ARNm de SATB1 en T_{conv} y T_{reg} evaluados por qPCR después del cultivo durante 72 h (media +/- DE, se realizaron 5 experimentos individuales).

Fig. 2: SATB1 se regula por disminución durante la inducción de linfocitos T reguladores humanos. Linfocitos T CD45RA⁺CCR7⁺CD4⁺ humanos sin tratamiento previo tanto se dejaron sin estimular (T_{no est}), se estimularon con perlas de CD3 y CD28 (T_{estim}) como se estimularon en presencia de TGFβ para convertirse en linfocitos T reguladores inducidos (iT_{reg}). Se estudiaron al menos 3 donantes y se representa la media +/- DE; * p < 0,05. **a:** Expresión de ARNm de SATB1 (media +/- DE) como se ha evaluado por qRT-PCR después de 5 d (n= 6). **b:** Análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas SATB1 en un experimento representativo (izquierda) y expresión relativa de SATB1 (n= 3, media +/- DE, derecha). **c:** Análisis de citometría de flujo de la expresión de proteínas CD25 en T_{estim} y iT_{reg} para un donante representativo (izquierda) y expresión de CD25 media +/- DE

(derecha) después de 5 días (n=4). d: Evaluación por CBA de la secreción de citocinas IL6 y IFN- γ (n=7, media +/- DE).

Fig. 3: SATB1 se desregula *in vivo* en linfocitos T_{reg} deficientes en FOXP3 a partir de ratones DEREg. a: Análisis de expresión de ARNm de SATB1 (media +/- DE; * $p < 0,05$) en T_{conv} y T_{reg} derivados de ratones DEREg macho. Se muestra un representante de dos experimentos independientes. b: Tinción intracelular para SATB1 en un experimento representativo en T_{reg} y T_{conv} de ratones DEREg. c: Tinción inmunofluorescente de timocitos para la expresión de proteínas SATB1 (rojo) en T_{reg} GFP⁺ (verde) contrateñidos con DAPI (azul) y CD4 (magenta) de ratones DEREg macho y DEREg deficientes en FOXP3 (DEREG x scurfy) como se ha evaluado por tinción cuádruple. d: Expresión de ARNm de SATB1 (media +/- DE; * $p < 0,05$) en T_{conv} y T_{reg} derivados de ratones DEREg x scurfy machos deficientes en FOXP3 evaluado por qRT-PCR. Se muestra un representante de dos experimentos independientes. e: Análisis de citometría de flujo de la expresión de proteínas SATB1 intracelulares en T_{reg} GFP⁺ suficientes para FOXP3 (FOXP3⁺, izquierda) y deficientes (FOXP3⁻, derecha) de ratones DEREg hembra heterocigóticos para la mutación scurfy. f: Tinción inmunofluorescente para la expresión de proteínas SATB1 (rojo) y FOXP3 (verde) en T_{reg} GFP⁺ clasificados de tejido de timo de ratones DEREg hembra heterocigóticos para la mutación scurfy contrateñidos con DAPI (azul).

Fig. 4: Supresión directa de la transcripción de ARNm de SATB1 por FOXP3. a: Representación de la región genómica de SATB1 genómica humana y el sitio de unión de FOXP3 conservado. b: Ensayo de desplazamiento por electromovilidad (EMSA) que evalúa la unión de FOXP3 a la región de SATB1 genómica (intrón 2). Extractos nucleares de T_{reg} naturales humanos expandidos; oligo de SATB1: nucleótido específico para el sitio de unión a FOXP3 en la región genómica de SATB1; oligo de FKH: nucleótido que contiene el motivo forkhead general; oligo de mSATB1: nucleótido mutado para el sitio de unión de FOXP3 en la región de SATB1 genómica. c: Unión de FOXP3 a la región de SATB1 genómica en el intrón 2 evaluado por CHIP-qPCR. Se realizó PCR usando un conjunto de cebadores correspondiente a la región del intrón 2 de SATB1 y el anticuerpo para FOXP3 o IgG de control precipitó cromatina aislada de T_{reg} naturales humanos expandidos. Se usó el sitio del promotor de IL7R como positivo, la región del intrón 4 de IL7R como control negativo. Aquí se muestra un experimento representativo de 2. d: Se evaluó la actividad de luciferasa por análisis luminométrico después de la transfección de una construcción indicadora que contiene el posible sitio de unión de FOXP3 en la región genómica de SATB1 en el intrón 2 o con un motivo mutado en células HEK293. Se evaluó la unión de FOXP3 en comparación entre células transfectadas con un vector de control o que expresa FOXP3 (media +/- DE; * $p < 0,05$) en comparación con el motivo mutado. Se muestra un representante de tres experimentos independientes. e-g: T_{reg} naturales humanos purificados por MACS tanto se transfectaron con un ARNip de control negativo como ARNip específico de FOXP3 y se evaluó 48 h después de la inactivación. e: Expresión de ARNm de SATB1 (media +/- DE; * $p < 0,05$) en T_{reg} naturales humanos primarios suficientes en FOXP3 (ARNip de control) y deficientes (ARNip de FOXP3) evaluados por qRT-PCR. f: Análisis de expresión de ARNm de IL-5 y IFN- γ (n=4, media +/- DE) en T_{reg} naturales humanos primarios suficientes en FOXP3 (ARNip de control) y deficientes (ARNip de FOXP3) evaluados por qRT-PCR. g: Evaluación por CBA de la secreción de citocinas IL-4 y IFN- γ (triplicados, media +/- DE) de T_{reg} naturales humanos primarios suficientes en FOXP3 (ARNip de control) y deficientes (ARNip de FOXP3) (n=4). h: Evaluación de la expresión de ARNm de IL-5 y IFN- γ (media +/- DE) en T_{reg} naturales humanos primarios transfectados con ARNip específico de SATB1 después del silenciamiento de FOXP3 48 horas después de la inactivación. i: Análisis de la expresión de FOXP3 (izquierda) y SATB1 (derecha) en linfocitos T CD4⁺ empobrecidos en T_{reg} convencionales humanos lentiviralmente transfectados con FOPX3 por qRT-PCR (media +/- DE, n=5, * $p < 0,05$).

Fig. 5: Regulación de SATB1 por miARN. a: Expresión media de miR-155 en T_{reg} naturales humanos en comparación con T_{conv} (media +/- DE; n=7, * $p < 0,05$) como se ha evaluado por qPCR. b: Representación de la región genómica de SATB1 genómica humana y el sitio de unión de miR-155 conservado en 3' UTR (SEC ID N°: 43). c: Se evaluó la actividad de luciferasa por análisis luminométrico después de la transfección de una construcción indicadora que contiene 3' UTR de SATB1 en células HEK293. La regulación de la expresión de SATB1 por miR-155 se evaluó por transfección de miR-155 en comparación con un miARN de control negativo (media +/- DE; * $p < 0,05$). Se usó la mutación del motivo de miR-155 para demostrar la especificidad. Se muestra un representante de tres experimentos independientes. d: T_{reg} naturales humanos purificados por MACS tanto se transfectaron con un ARNip de miR-122 (control) como ARNip específico de miR-155 y la regulación de la expresión de ARNm de SATB1 se evaluó 48 h después de la inactivación por qRT-PCR (media +/- DE, n=5, * $p < 0,05$). f: Metilación de ADN de la isla CpG predicha en la región genómica de SATB1 en T_{reg} y T_{conv} .

Fig. 6: Disposición de experimentos en micromatrices realizados para identificar la expresión de SATB1 y la regulación de microARN en T_{reg} . Se evaluaron linfocitos T CD4⁺ humanos, T_{conv} CD4⁺ CD25⁻, T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ y T_{reg} expandidos tanto directamente después del aislamiento (reposo), después de hasta 24 h de cultivo celular sin estimulación adicional (reposo), como después de la activación por diversos estímulos (activados). También se incluyen condiciones inhibitoras de linfocitos T CD4⁺ estimulados en presencia de señales inhibitoras que incluyen IL10, prostaglandina-E2 (PGE2), PD1, CTLA-4 o TGF β 1. Si no se indica de otro modo, las células se estimularon

durante 8 h antes de recogerse para el análisis de micromatrices (véase también la Tabla 1).

Fig. 7: Evaluación de miR-155 por análisis de matrices. Expresión de miR-155 media en nT_{reg} humanos en comparación con T_{conv} como se ha evaluado por análisis de micromatrices de miARN. Se estudiaron al menos 3 donantes y se representa la media +/- DE; * $p < 0,05$.

5 Fig. 8: Influencia de la activación y estimulación de TGF β sobre la secreción de citocinas TH1/TH2 en T_{conv} y T_{reg} . Se purificaron nT_{reg} CD4⁺ CD25^{alto} CD127^{bajo} por clasificación por MACS (>96 % de pureza). Se usaron T_{conv} CD4⁺ CD25⁺ para la comparación. Se evaluó la influencia de la activación (perlas CD3 + CD28) y estimulación de TGF β sobre la liberación de IL6 y IFN- γ en T_{conv} (barras grises) y T_{reg} (barras blancas) por matrices de perlas citométricas. Se cultivaron células durante 72 h, se estudiaron 4 donantes y se representa la media +/- DE; * $p < 0,05$.

10 Fig. 9: Expresión de FOXP3 y función supresora de linfocitos T reguladores inducidos. Linfocitos T CD45RA⁺CCR7⁺CD4⁺ humanos sin tratamiento previo tanto se dejaron sin estimular ($T_{no\ est}$), se estimularon con perlas de CD3 y CD28 (T_{estim}) como se estimularon en presencia de TGF β para convertirse en linfocitos T reguladores inducidos (iT_{reg}). Se estudiaron al menos 3 donantes y se representa la media +/- DE; * $p < 0,05$. a: Expresión de ARNm de FOXP3 (media +/- DE) como se ha evaluado por qRT-PCR después de 5 d (n= 6). b: Tinción intracelular de FOXP3 en un experimento representativo (izquierda) y expresión de FOXP3 media +/- DE (derecha) después de 5 d (n= 4). c: Análisis de citometría de flujo de la función reguladora de $T_{no\ est}$, T_{estim} e iT_{reg} como se ha evaluado por la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ alógenos a una relación 1:1; aquí se muestran la tinción por CFSE de un experimento representativo (izquierda) y la actividad supresora media +/- DE (n=9) de $T_{no\ est}$, T_{estim} e iT_{reg} (derecha). Los linfocitos T CD4⁺ convencionales en reposo sirvieron de control negativo, los linfocitos T alógenos estimulados con perlas CD3 y CD28 de control positivo.

Fig. 10: Análisis de citometría de flujo de la expresión de SATB1 en ratones DEREK. Se tiñeron T_{reg} , además de T_{conv} , de ratones DEREK para CD4, FOXP3 y SATB1 y dependieron de la expresión de CD4, GFP y FOXP3. La expresión de SATB1 en linfocitos T_{reg} y T_{conv} de nodos linfáticos (a) y timo (b) se evaluó por citometría de flujo. Los valores de MFI se presentan en las esquinas izquierda resp. derecha superiores para T_{reg} resp. T_{conv} .

25 Fig. 11: Análisis de micromatrices de la expresión de SATB1 en T_{reg} de ratones Δ FOXP3. Se reanalizaron los datos de micromatrices de Williams, L. M. & Rudensky, A. Y., Nat Immunol 8, 277-284 (2007) para la expresión de SATB1 en linfocitos T_{reg} y T_{reg} inactivados de FOXP3.

Fig. 12: Conservación del sitio de unión de FOXP3 en el sitio SATB1 con respecto a varios mamíferos (SEC ID N°: 35-42). El alineamiento de secuencias se realizó usando ClustalW.

30 Fig. 13: Inactivación de FOXP3 en T_{reg} humanos primarios. Se transfectaron T_{reg} humanos tanto con ARNip de control como ARNip específico de FOXP3 y se evaluaron 48 horas después de la inactivación. a: Expresión relativa de ARNm de FOXP3 (media +/- DE, n=6, * $p < 0,05$). b: Análisis representativo de citometría de flujo de la expresión de FOXP3 intracelular 48 horas después de la inactivación de FOXP3 en T_{reg} . c: Expresión de proteínas FOXP3 media (media +/- DE, n=6, * $p < 0,05$). d: Función supresora de T_{reg} tratados con ARNip de control o de FOXP3 evaluada en un ensayo supresor convencional usando linfocitos T alógenos CD4⁺ como lectura. Se muestra un experimento representativo. e: Capacidad inhibidora media (media +/- DE, n=3, * $p < 0,05$).

40 Fig. 14: Diferenciación de TH1/TH2 de T_{reg} de ratones DEREK x scurfy. Para evaluar si T_{reg} que expresan SATB1 se diferencian en linfocitos T colaboradores que expresan citocinas TH1/TH2, los presentes inventores aislaron T_{reg} GFP⁺ y se analizó la producción de ARNm de IL-6 (a) y IFN- γ (b) por T_{reg} derivados de ratones DEREK o DEREK x scurfy. Se muestra un representante de dos experimentos independientes.

Fig. 15: T_{conv} transfectados con FOXP3 muestran producción reducida de citocina. Análisis de la expresión de IL-5 (izquierda) e IFN γ (derecha) en linfocitos T CD4⁺ empobrecidos en T_{reg} convencionales humanos lentiviralmente transfectados con FOPX3 por qRT-PCR (media +/- DE, n=5, * $p < 0,05$).

45 Fig. 16: miR-155 se expresa altamente en iT_{reg} humanos. Análisis de la expresión de miR-155 en linfocitos $T_{no\ est}$, T_{estim} y iT_{reg} por PCR específica de miARN.

Fig. 17: miR-155 es una diana en la dirección 3' de FOXP3 en linfocitos T humanos. a: La regulación de miR-155 después de la inactivación de FOXP3 en nT_{reg} humanos se analizó por PCR específica de miARN en comparación con un ARNip de control. b: Después de la transducción lentiviral de T_{conv} CD4⁺ con tanto FOXP3 como un vector de control se evaluó la expresión de miR-155 por PCR específica de miARN.

50 Fig. 18: Metilación de ADN de la isla CpG para el sitio FOXP3 en T_{reg} y T_{conv} .

Fig. 19: Metilación de histonas en el sitio del gen SATB1. Se reanalizaron los datos publicados por Wei, G. y col.,

Immunity 30:155-167 (2009) para los mapas de expresión de SATB1 y de metilación de histonas en linfocitos T sin tratamiento previo murinos, T_{efector} (ThH1, TH2, resp. TH17), iT_{reg} y nT_{reg} . a. Expresión de SATB1 como se ha evaluado por el análisis de micromatrices. b. Los datos de secuenciación de ChIP se re-analizaron para el sitio SATB1. La trimetilación de H3K4 está asociada a la activación génica, mientras que la di- y trimetilación de H3K27 están asociadas a la represión génica. En ninguno de los subconjuntos de linfocitos T se detectó la trimetilación de H3K27, mientras que T_{efector} mostró altos niveles de metilación de H3K4 y menor metilación de T_{reg} .

Fig. 20: Modelo para el modo de acción de FOXP3 y miR155 de la expresión de proteínas SATB1 y secreción de citocinas TH1 y TH2 en la dirección 3'.

Fig. 21: Represión dependiente de FOXP3 de la expresión de SATB1 en linfocitos T reguladores. (a) Análisis de micromatrices de expresión de ARNm de SATB1 en linfocitos T convencionales (T_{conv} , azul) y linfocitos T reguladores (T_{reg} , rojo) bajo diferentes condiciones; act = activados mediante TCR durante 8 h, rep = sin activación, TGF = estimulación con TGF β durante 8 h, exp = expandidas con TCR y coestimulación durante 7 d. Experimentos representativos de un total de 46 condiciones que comprenden 171 experimentos en matriz. (b) Expresión relativa de ARNm de SATB1 en T_{reg} y T_{conv} evaluados por qRT-PCR (media +/- DE, n= 5; * p< 0,05). (c) Análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas SATB1 en un donante representante (izquierda) y expresión relativa de SATB1 (n= 6, media +/- DE, derecha; * p< 0,05). (d) Análisis de citometría de flujo de la expresión de proteínas SATB1 en T_{conv} y T_{reg} para un donante representante (izquierda) y expresión media de SATB1 +/- DE (derecha, n= 11; * p< 0,05). (e) Análisis de citometría de flujo de la expresión de proteínas SATB1 en T_{conv} y T_{reg} después de la estimulación (3 d; n= 4; * p< 0,05). (f)-(h) para linfocitos T humanos sin tratamiento previo de 5 d se dejaron sin estimular ($T_{\text{no est}}$), se estimularon con perlas de CD3 y CD28 (T_{estim}) o se estimularon en presencia de TGF β para obtener linfocitos T reguladores inducidos (iT_{reg}). (f) Expresión de ARNm de SATB1 (media +/- DE) como se ha evaluado por qRT-PCR después de 5 d (n= 6; * p< 0,05). (g) Análisis de citometría de flujo de la expresión de proteínas SATB1 después de 5 d en un experimento representativo (izquierda) y expresión relativa de SATB1 (derecha, n= 3, media +/- DE; * p< 0,05). (h) Evaluación por CBA de la secreción de citocinas de IL4 y IFN- γ (media +/- DE; * p< 0,05). (i) Análisis de la expresión de ARNm de SATB1 (media +/- DE; * p< 0,05) en T_{conv} y T_{reg} derivados de ratones DEREK macho, además de ratones DEREK x scurfy deficientes en FOXP3 como se ha evaluado por qRT-PCR. Se muestra un representante de dos experimentos independientes. (j) Tinción por inmunofluorescencia para la expresión de proteínas SATB1 (rojo) y FOXP3 (verde) en T_{reg} GFP $^{+}$ clasificados del bazo de ratones DEREK hembra heterocigóticos para la mutación scurfy contrateñida con DAPI (azul). (k) Análisis de citometría de flujo de la expresión de proteínas SATB1 intracelulares en timocitos positivos individuales CD4 $^{+}$ (izquierda, gris claro), además de T_{reg} GFP $^{+}$ suficientes para FOXP3 positiva individual tímica (FOXP3 $^{+}$, centro, gris oscuro) y deficientes (FOXP3 $^{-}$, derecha, negro) de ratones DEREK hembra heterocigóticos para la mutación scurfy mostrada para un donante representativo (izquierda) y como expresión de SATB1 media +/- DE (derecha, n= 2). Control de isotipo mostrado como línea continua.

Fig. 22: Supresión directa de la transcripción de ARNm de SATB1 por FOXP3. (a) FOXP3. Datos de matrices de baldosas ChIP de linfocitos T_{reg} expandidos humanos recubiertos en sitio de SATB1 humano. (b) Representación de la región genómica de SATB1 genómica humana y los sitios de unión de FOXP3. (c) Se evaluó la unión de FOXP3 a las regiones de SATB1 genómicas por ChIP-qPCR sobre cromatina aislada de T_{reg} naturales humanos expandidos. Se realizó PCR usando un conjunto de cebadores específico para la región correspondiente en el sitio de SATB1. Se representa el enriquecimiento en FOXP3-ChIP sobre el ADN de entrada normalizado para controlar IgG. Aquí se muestra un experimento representativo de 2. (d) Se definieron K_D para la unión de FOXP3 al sitio de SATB1 por RIA para motivos de unión a modo de ejemplo. (e) Se evaluó la actividad de luciferasa por análisis luminométrico después de la transfección de una construcción indicadora que contiene los posibles sitios de unión de FOXP3 en el sitio de SATB1 genómico o con un motivo mutado. Se evaluó la unión de FOXP3 en comparación entre células transfectadas con un vector de control o que expresa FOXP3 (media +/- DE; * p< 0,05) en comparación con el motivo mutado. Se muestra un representante de tres experimentos independientes. (f)-(i) T_{reg} naturales humanos purificados por MACS tanto se transfectaron con un ARNip de control negativo como ARNip específico de FOXP3, (f) expresión de ARNm de SATB1 (media +/- DE; n= 6, * p< 0,05) evaluada por qRT-PCR en T_{reg} naturales humanos primarios suficientes en FOXP3 (ARNip de control) y deficientes (ARNip de FOXP3) cultivados durante 36 h en presencia de CD3 y IL-2 o CD3 y CD28. (g) Análisis de la expresión de ARNm de IL-5 y IFN- γ por qRT-PCR (n= 4, media +/- DE, * p< 0,05) en T_{reg} naturales humanos primarios suficientes en FOXP3 (ARNip de control) y deficientes (ARNip de FOXP3) estimulados durante 48 h en presencia de CD3 y IL-2 después de la inactivación. (h) Evaluación por CBA de la secreción de citocinas de IL-4 y IFN- γ de T_{reg} naturales humanos primarios suficientes en FOXP3 (ARNip de control) y deficientes (ARNip de FOXP3) (media +/- DE, * p< 0,05) estimulados durante 48 h en presencia CD3 e IL-2 después de la inactivación. (i) Evaluación de la expresión de ARNm de IL-5 y IFN- γ (media +/- DE) en T_{reg} naturales humanos primarios transfectados con ARNip específico de SATB1 después del silenciamiento de FOXP3 48 h después de la inactivación estimulados con CD3 y CD28 (n= 4, media +/- DE, ANOVA unilateral, * p< 0,05). (j) Análisis de expresión de FOXP3 (izquierda) y SATB1 (derecha) en linfocitos T CD4 $^{+}$ empobrecidos en T_{reg} convencionales humanos lentiviralmente transfectados con FOPX3 por qRT-

PCR (media +/- DE, n= 5, * p< 0,05).

Fig. 23: La expresión de SATB1 reprograma linfocitos T reguladores en linfocitos T efectores. (a) Análisis de la función supresora de T_{reg} humanos lentiviralmente transfectados con SATB1 (derecha, azul) o vector de control (dsRed, izquierda, rojo) mostrado para un donante representativo (izquierda) y como proliferación media de linfocitos T de CD8⁺ +/- DE (derecha, n= 3, * p< 0,05). (b) Evaluación por CBA de la secreción de citocinas IL-4 y IFN- γ de T_{reg} transducidos con SATB1, además de transducidos con control, 4 y 16 h después de la estimulación con perlas recubiertas con CD3/CD28 (media +/- DE, * p<0,05). (c) Genes regulados por incremento y por disminución en T_{reg} transducidos con SATB1. Los datos se normalizaron a la puntuación z. (d) Clasificación de genes inducidos por SATB1 según las comparaciones entre linfocitos T_{conv} y T_{reg}, linfocitos T no estimulados y sin tratamiento previo estimulados con CD3/CD28 y genes comunes a ambos subconjuntos (T_{conv} y linfocitos T activados). (e) Patrón de expresión de genes dependientes de SATB1 que contribuyen posiblemente a la reprogramación de T_{reg} en T_{efector}, clasificados en genes específicos para TH1, TH2 y TH17. Los datos se normalizaron a la puntuación z.

Fig. 24: Regulación de SATB1 por miARN. (a) Metilación de ADN de las islas CpG predichas en la región genómica de SATB1 en T_{reg} y T_{conv}. (b) Representación de la 3' UTR de SATB1 genómica humana y los sitios de unión de miARN conservados. (c) Expresión de miARN media para miR-155, miR-21, miR-7, miR-34a y miR-18a en T_{reg} naturales humanos en comparación con T_{conv} (media +/- DE; n= 5, * p< 0,05) como se ha evaluado por qPCR. (d) La correlación de la expresión de miARN con la expresión de ARNm de SATB1 se representa contra las veces de cambio de miARN (T_{reg} frente a T_{conv}) para todos los 735 miARN evaluados. Se resaltan miR-155, miR-21, miR-7, miR-34a y miR-18a. (e) Unión de FOXP3 al sitio genómico de miR-155, miR-21 y miR-7 en linfocitos T_{reg} naturales humanos como se define por matrices de baldosas ChIP de FOXP3. (f) Se evaluó la actividad de luciferasa por análisis luminométrico después de la transfección de una construcción indicadora que contiene la 3' UTR de SATB1. Se evaluó la regulación de la expresión de SATB1 por miARN por transfección del miARN correspondiente en comparación con un miARN de control (media +/- DE; * p< 0,05). Se usó mutación del motivo de miARN para demostrar la especificidad. Se muestra un representante de tres experimentos independientes. (g) Análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas SATB1 en T_{reg} clasificadas de ratones con una pérdida de DICER completa específica de T_{reg} (DICER^{fl/fl}) en comparación con T_{reg} DICER^{w^{fl}/fl}.

Fig. 25: Disposición de experimentos en micromatrices realizados para identificar la expresión de SATB1 y regulación de microARN en T_{reg}. Se evaluaron linfocitos T CD4⁺ humanos, T_{conv} CD4⁺ CD25⁻, T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ y T_{reg} expandidos tanto directamente después del aislamiento (reposo), después de hasta 24 h de cultivo celular sin estimulación adicional (reposo) como después de la activación por diversos estímulos (activados). También se incluyeron condiciones inhibitoras de linfocitos T CD4⁺ estimulados en presencia de señales inhibitoras que incluyen IL-10, prostaglandina-E2 (PGE2), PD1, CTLA-4 o TGF β 1. Si no se indica de otro modo, se estimularon células durante 8 h antes de la recogida para el análisis de micromatrices (véase también la Tabla 1).

Figura 26: Evaluación citométrica del flujo de la expresión de proteínas SATB1 en T_{conv} y T_{reg} estimulados. Análisis de citometría de flujo de la expresión de proteínas SATB1 en T_{conv} y T_{reg} después de la estimulación con CD3 y IL-2 o CD3 y CD28 durante 3 d ejemplificado para un donante. Se presentan valores de MFI en la esquina derecha superior para T_{reg} y T_{conv}, respectivamente.

Fig. 27: Análisis de la expresión de SATB1 en T_{reg} murinos. (a) Se tiñeron T_{reg} tímicos, además de T_{conv} de ratones DREG, para CD4, CD8, FOXP3 y SATB1 y se seleccionaron para la expresión CD4, CD8, GFP y FOXP3. La expresión de SATB1 en linfocitos T_{reg} y T_{conv} de tejido de timo se evaluó por citometría de flujo y se muestra para un donante representativo (izquierda) y como expresión de SATB1 media +/- DE (derecha, n=3). La expresión de SATB1 en timocitos positivos individuales CD4⁺ fue considerablemente superior a en T_{conv} CD4⁺ del bazo (datos no mostrados) ya que la expresión de SATB1 es esencial para el desarrollo de timocitos (Alvarez, J. D. y col., Genes Dev 14, 521-535 (2000)), todavía fue detectable una regulación por disminución significativa de SATB1 en T_{reg} en ambos tejidos (datos no mostrados). Se presentan valores de MFI en la esquina superior izquierda o derecha para T_{reg} y T_{conv}, respectivamente. (b) Análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas SATB1 en T_{reg} y T_{conv} murinos. (c) y (d) Tinción por inmunofluorescencia para la expresión de proteínas SATB1 (rojo) y GFP (verde) en timocitos de ratones DREG macho contrateñidos con DAPI (azul).

Fig. 28: Evaluación de la unión de FOXP3 al sitio de SATB1. Las KD para la unión de FOXP3 al sitio de SATB1 se definieron por RIA para los motivos de unión de FOXP3 identificados en el sitio genómico de SATB1 en comparación con motivos mutados como se ejemplifica para BS5 y BS6.

Fig. 29: Inactivación de FOXP3 en T_{reg} humanos primarios. T_{reg} humanos tanto se transfectaron con ARNip de control como ARNip específico de FOXP3 y se evaluaron 48 h después de la inactivación. (a) Expresión relativa de ARNm de FOXP3 (media +/- DE, n=6, * p<0,05). (b) Análisis de citometría de flujo representativo de la expresión de FOXP3 intracelular 48 h después de la inactivación de FOXP3 en T_{reg}. (c) Expresión de proteínas FOXP3 media

(media +/- DE, n= 6, * p< 0,05). (d) Función supresora de T_{reg} tratados con ARNip de control o de FOXP3 evaluada en un ensayo supresor estándar usando linfocitos T alógenos CD4⁺ como lectura. Se muestra un experimento representativo. (e) Capacidad inhibidora media (media +/- DE, n= 3, * p< 0,05).

5 Fig. 30: Diferenciación de TH1/TH2 de T_{reg} de ratones DEREg x scurfy. Para evaluar si los T_{reg} que expresan SATB1 se diferencian en linfocitos T colaboradores que expresan citocinas TH1/TH2, los presentes inventores aislaron T_{reg} GFP⁺ y analizaron (a) la producción de ARNm de IL-6 y (b) de IFN- γ por T_{reg} derivados de ratones DEREg o DEREg x scurfy. Se muestra un representante de dos experimentos independientes.

10 Fig. 31: T_{conv} transfectados con FOXP3 muestran producción reducida de citocinas. Análisis de la expresión de IL-5 (izquierda) y IFN- γ (derecha) en linfocitos T CD4⁺ empobrecidos en T_{reg} convencionales humanos lentiviralmente transducidos con FOPX3 por qRT-PCR (media +/- DE, n= 5, * p< 0,05).

Fig. 32: Metilación de ADN de la isla CpG del sitio de FOXP3 en T_{reg} y T_{conv}.

15 Fig. 33: Metilación de histonas en el sitio del gen SATB1. Se reanalizaron datos muy recientemente publicados sobre la metilación de histonas del genoma completo (Wei, G. y col., Immunity 30, 155-167, (2009)) para la expresión de mapas de SATB1 y de metilación de histonas en linfocitos T sin tratamiento previo murinos, T_{efector} (TH1, TH2, resp. TH17), iT_{reg} y nT_{reg}. (a) Expresión de SATB1 como se ha evaluado por análisis de micromatrices. (b) y (c) Se reanalizaron los datos de secuenciación de ChIP para el sitio de SATB1. La trimetilación de H3K4 está asociada a la activación génica, mientras que la di- y trimetilación de H3K27 están asociadas a la represión génica. Se detectó trimetilación de baja a ausente de H3K27 en los subconjuntos de linfocitos T analizados, mientras que T_{efector} mostró altos niveles de metilación de H3K4 y T_{reg} menor metilación. (b) Datos acumulados para T sin tratamiento previo, TH1, TH2, TH17, iT_{reg} y nT_{reg}. (c) Análisis de islas de trimetilación (rojo: H3K4, azul: H3K27) mapeadas sobre el sitio de SATB1 genómico.

20

25 Fig. 34: Expresión de SATB1 después del silenciamiento mediado por ARNip de miR-155 en T_{reg}. Se transfectaron T_{reg} naturales humanos purificados por MACS con tanto un inhibidor de control o de miR-155 y se evaluó la regulación de la expresión de ARNm de SATB1 48 h después de la inactivación por qRT-PCR (media +/- DE, n= 5, * p< 0,05) en T_{reg} no estimulados, estimulados con CD3 y IL-2, o CD3 y CD28.

Fig. 35: Expresión de SATB1 en T_{reg} empobrecidos en miARN. Análisis de transferencia Western de la expresión de proteínas SATB1 en T_{reg} clasificados de ratones con un pérdida de DICER completa específica de T_{reg} (DICER^{fl/fl}) en comparación con T_{reg} DICER^{wt/fl}.

30 Fig. 36: Modelo para el modo de acción de FOXP3. (a), (b) Modelo para la remodelación dependiente de SATB1 mediada por FOXP3 y miARN de los sitios genómicos respectivos para la liberación de citocinas TH1 y TH2 y la inducción de la función supresora de T_{reg}.

Descripción detallada de la invención

35 Los procedimientos de los aspectos (1) a (5) de la invención identifican los linfocitos T reguladores en la población de células debido a la reducción significativa (o incluso ausencia) de la unión de tales linfocitos T reguladores a ligandos que se unen específicamente a SATB1 en comparación con las células restantes de la población de células. En otras palabras, todas las células (excepto los linfocitos T reguladores) de la población de células muestran la unión con dichos ligandos.

40 Los "ligandos" según la invención pueden ser anticuerpos o fragmentos de los mismos, que incluyen anticuerpos humanos, murinos, de conejo y cabra, y fragmentos de anticuerpos. Ligandos particularmente adecuados son anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.

Según la los ligandos/anticuerpos llevan restos funcionales que permiten la detección, que incluyen, pero no se limitan a, marcas (tales como colorantes de fluorescencia y bioluminiscencia y marcas radiactivas), ligandos (tales como ADN, ARN y moléculas de proteínas, moléculas de fusión de Ig, moléculas de ARN bifuncional y moléculas penetrantes en la membrana celular que se acoplan a un ligando), toxinas (tales como ricina, lectina y toxina diftérica).

45 El procedimiento de la invención es aplicable a cualquier tipo de población de células que incluye, pero no se limita a, cultivo celular, sangre completa y fracciones de sangre completa, y células de cualquier origen que incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero tales como células humanas y células murinas.

50 En una realización particularmente preferida, el procedimiento es adecuado para el control de calidad de poblaciones de linfocitos T, en particular de poblaciones de linfocitos T reguladores, en las que los linfocitos T efectoras contaminantes se detectan en la población de linfocitos T reguladores, o una población de linfocitos T efectora, en la que los linfocitos T reguladores contaminantes se detectan en la población de linfocitos T efectoras.

El procedimiento de la invención puede combinarse con otros procedimientos de detección de linfocitos T reguladores conocidos en la técnica. Para identificar linfocitos T humanos se desea que la población de linfocitos T se ponga en contacto con uno o más ligandos que se unen específicamente a CD4, CD25 y/o CD127 sobre los linfocitos T. Otro procedimiento es ensayar la expresión de FOXP3. El kit del aspecto (6) de la invención puede comprender, aparte de los ligandos/anticuerpos/fragmentos de anticuerpos, tampones y reactivos para realizar el procedimiento de detección de la invención, suspensiones de células convencionales y también reactivos para realizar los procedimientos de detección adicionales citados anteriormente.

La invención se describe además en los siguientes ejemplos que, sin embargo, no deben interpretarse como una limitación de la invención.

10 Ejemplos

Materiales y procedimientos

Ratones: Se compraron ratones C57BL/6 (B6) de Jackson Laboratory. Previamente se han descrito ratones *DEREG*, *scurfy* y *DEREG x scurfy* (Brunkow, M.E. y col., Nat. Genet. 27:68-73 (2001); Lahl, K. y col., J. Immunol. in revision; Lahl K. y col., J. Exp. Med. 204:57-63 (2007)). Los ratones *DEREG x scurfy* macho fueron indistinguibles de los ratones *scurfy* en lo referente a las manifestaciones inmunológicas y clínicas de autoinmunidad, mientras que los ratones *DEREG* hembra heterocigóticos para FOXP3 estuvieron libres de síntomas. Se alojaron los ratones bajo condiciones específicas libres de patógenos y se usaron según las pautas del Comité Institucional para el Cuidado Animal en el Instituto para Microbiología, Inmunología e Higiene Médica, TU Munich.

Anticuerpos y análisis de FACS: Se compraron anticuerpos conjugados con colorante fluorescente de BD, Biolegend o eBioscience. Se preparó anticuerpo monoclonal de ratón anti-SATB1 humana conjugado con Alexa 647 (clon 14) reactivo de forma cruzada con SATB1 murina marcando el anticuerpo comercialmente disponible (número de material de BD Biosciences 611182) con el colorante. Los datos de FACS se adquirieron sobre un citómetro de flujo FACSCanto (Becton Dickinson) y se analizaron usando el paquete de software FlowJo (Tri-Star). Se realizó tinción intracelular de FOXP3 y SATB1 humanas y murinas usando tanto el kit de tinción de linfocitos T reguladores de ratón de FOXP3 humana como de ratón (Biolegend) con la adición de reactivos de bloqueo de FcR (CD16/CD32 o IgG humana) 15 min antes de la tinción intranuclear.

Purificación y clasificación de T_{reg} humanos: Se purificaron T_{reg} y T_{efector} humanos de sangre completa de donantes humanos sanos en cumplimiento con los protocolos del comité de ética médica (IRB) por selección negativa usando CD4-RosetteSep (Stem Cell), seguido de selección positiva usando perlas de MACS específicas de CD25 (Miltenyi Biotech) o clasificando en un clasificador de células FACSDiVa (Becton Dickinson) después de incubar las células con combinaciones de anticuerpos monoclonales marcados para fluorocromo con CD4, CD25 y CD127. Para experimentos con células no clasificadas, solo se usaron muestras con >95 % de T_{reg}.

Purificación y clasificación de T_{reg} murinos: Se purificaron T_{reg} GFP⁺ murinos de timo, bazo o ganglios linfáticos periféricos clasificando en un citómetro de alto rendimiento MoFlo (Beckman Coulter) directamente o después del enriquecimiento positivo de linfocitos T CD4⁺ después de la selección positiva usando perlas de MACS específicas de CD4 (Miltenyi Biotech).

Generación de T_{reg} inducidos: Se purificaron linfocitos CD4⁺ humanos de sangre completa de donantes humanos sanos por selección negativa usando CD4-RosetteSep (Stem Cell). A continuación, esta población se incubó con perlas de MACS específicas de CD25 (Miltenyi Biotech). Después de la selección negativa, se incubaron linfocitos CD4⁺ convencionales con perlas de MACS específicas de CD45RA (Miltenyi Biotech). Se obtuvieron linfocitos T convencionales sin tratamiento previo pasando la mezcla de células sobre columnas de separación magnética MidiMACS (Miltenyi Biotech) y recogiendo los linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ CD45RA⁺. Se estimularon linfocitos T CD4⁺ empobrecidos en T_{reg} sin tratamiento previo (5×10^4 células pocillo⁻¹) en medio Aim-V/X-Cell sin suero (50 % /50 % V/V) con 5×10^4 perlas magnéticas recubiertas con 5 % de CD3 (OKT3, Ortho Biotech), 12 % de CD28 (9,3) y 83 % de anticuerpo monoclonal anti-MHC-I (W6/32) pocillo⁻¹ y TGFβ1 (R&D Systems) 5 ng ml⁻¹ durante un periodo de 7 días en ausencia de IL-2. El TGFβ1 no se trató con ácido antes de la adición. La composición descrita de perlas se optimizó para la inducción de linfocitos T_{reg}.

Ensayo de supresión *in vitro*: Para los ensayos de supresión *in vitro*, T_{efector} marcados con CFSE (1×10^5 células pocillo⁻¹) se co-cultivaron con T_{reg} naturales o inducidos marcados con PKH-26 a las relaciones indicadas en presencia de perlas magnéticas recubiertas con CD3/CD28/MHC-I ($3,3 \times 10^4$ perlas pocillo⁻¹) en placas de 96 pocillos en medio X-Vivo-15 complementado con 10 % de SBF durante 72 h. Se midió la dilución de CFSE en un citómetro de flujo FACSCanto.

Matriz de perlas citométricas de citocinas: Se midieron concentraciones de IL-4, IL-6 y IFN-gamma usando el kit II de citocinas TH1/TH2 humanas (BD Pharmingen).

- 5 qRT-PCR sobre muestras humanas: Se usó ARN total de T_{conv} o T_{reg} para generar ADNc junto con el kit de síntesis Transcriptor First Strand cDNA (Roche Diagnostics). Se realizó qRT-PCR usando el kit maestro LightCycler Taqman y el ensayo Universal Probe Library específico para SATB1, FOXP3, IL-5, IFN-gamma y microglobulina beta-2 (B2M; Roche Diagnostics). Para cada experimento se realizaron al menos dos duplicados técnicos. Los resultados se normalizaron a la expresión de B2M.
- Análisis de transferencia Western: Se prepararon lisados celulares de T_{conv} , iT_{reg} y nT_{reg} purificados como se describe previamente (Classen, S. y col., J. Immunol. 178:6931-6940 (2007)), seguido de transferencia Western con SATB1 o anticuerpos para beta-actina.
- 10 Expresión génica del genoma completo en células humanas: Se extrajo todo el ARN usando TRIZOL (Invitrogen) y se purificó en el laboratorio de los inventores usando procedimientos convencionales. Se realizaron amplificación de muestras, marcado e hibridación sobre Illumina WG6 Sentrix BeadChips V1 para todas las matrices en este estudio según las instrucciones del fabricante (Illumina) usando un Illumina BeadStation. Todos los datos de análisis se realizaron usando Bioconductor para el software estadístico R (<http://www.r-project.org>). Los valores de expresión se normalizaron y se resumieron usando el paquete IlluminaGUI. A partir de los conjuntos de datos resultantes, los presentes inventores extrajeron una lista de genes con una expresión diferente significativa en T_{reg} en comparación con T_{conv} . Puede accederse a datos de micromatrices bajo GSE15390.
- 15 Microscopía de inmunofluorescencia: Linfocitos sin purificar de ratones macho *DEREG* o *DEREG x scurfy* o T_{reg} GFP⁺ de ratones hembra *DEREG x scurfy* heterocigóticos purificados de timo, ganglios linfáticos y bazo se fijaron en paraformaldehído frío durante 10 min, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Triton-X y se bloquearon previamente en PBS que contenía 10 % de suero de cabra normal y 1 % de gelatina de piel de peces de agua fría durante 30 min. A continuación se incubaron portaobjetos en combinaciones de anticuerpos primarios (de conejo anti-GFP, de ratón anti-FOXP3, de rata anti-CD4, de ratón anti-SATB1-AF647) durante 60 min, se lavaron dos veces y se incubaron con anticuerpos secundarios (anti-AF488 de conejo, anti-AF555 de ratón, anti-AF555 de rata) durante 60 min, se tiñeron con DAPI y se examinó la fluorescencia usando un microscopio confocal Fluoview FV1000 de Olympus.
- 20 qRT-PCR de T_{reg} murinos: Se extrajo ARN total con el reactivo TRIZOL de T_{reg} CD4⁺ GFP⁺ suficientes y deficientes en FOXP3, además de T_{conv} purificados por FACS de ratones macho *DEREG* y *DEREG x scurfy*, respectivamente. Se sintetizó ADN complementario (Miltenyi). Se realizó qPCR usando el kit maestro LightCycler Taqman y el ensayo Universal Probe Library (Roche Diagnostics). Las secuencias de cebadores de PCR se enumeran en la Tabla 2.
- 25 Ensayos de desplazamiento por electromovilidad, inmunoprecipitación de cromatina y qPCR: Se realizaron EMSA con oligonucleótidos conjugados con colorante fluorescente como se ha descrito previamente (Mantel, P.Y. y col., J. Immunol. 176:3593-3602 (2006)) con extractos nucleares de T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ humanos expandidos purificados con MACS según las recomendaciones del fabricante (LI-COR) y se analizaron con el sistema de obtención de imágenes de infrarrojos Odyssey tras la electroforesis. Se realizaron ChIPs de anticuerpo para FOXP3 (eBioscience) e IgG (BD Bioscience) usando T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ humanos expandidos purificados con MACS siguiendo las instrucciones del fabricante (Active Motif). Se midió la abundancia relativa de regiones de interés en ADN precipitado por PCR semi-cuantitativa. Adicionalmente, se realizaron qPCR usando iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) con resultados iguales. Las secuencias de oligonucleótidos y cebadores de PCR se enumeran en la Tabla 3.
- 30 Perfilado de miARN y aRT-PCR: Se extrajo todo el ARN usando TRIZOL (Invitrogen) y se purificó en el laboratorio de los inventores usando procedimientos convencionales. Se realizaron amplificación de muestras, marcado e hibridación sobre la matriz de matrices de miARN Illumina con el kit de perfilado de la expresión humana MicroRNA v1 para todas las matrices en este estudio según las instrucciones del fabricante (Illumina) usando una Illumina BeadStation. Todos los análisis de datos se realizaron usando Bioconductor para el software estadístico R (<http://www.r-project.org>). Se normalizaron los valores de expresión y se resumen usando el paquete IlluminaGUI. A partir de los conjuntos de datos resultantes, los presentes inventores extrajeron una lista de miARN con una expresión diferente significativa en T_{reg} en comparación con T_{conv} . Para qRT-PCR específica de miARN, se extrajo ARN total usando TRIZOL. Se sintetizó ADN complementario de la primera hebra para cada miARN evaluado usando el kit TaqMan MicroRNA RT y el kit específico de miARN correspondiente (Applied Biosystems). Se midieron los niveles de miARN por qPCR usando TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems) en un ciclador iQ5 (Bio-Rad). Se usaron ARN nuclear pequeño U6 expresado ubicuamente o miR-26b para la normalización. Las secuencias de cebadores de PCR se enumeran en la
- 35 Silenciamiento de ARN específico de genes, inactivación de miARN y miARN agonista: Todos los ARNip, además de los miméticos e inhibidores de miARN, se compraron de Biomers o Dharmacon. Se diseñaron miméticos de miARN según las secuencias publicadas en miRBase y que se parecían a los productos de escisión por Dicer bicatenarios. Se diseñaron inhibidores de miARN como oligonucleótidos de 2'OM antisentido monocatenarios. Éstos se transfectaron en T_{reg} humanos primarios recientemente aislados con nucleofección como se ha descrito previamente (Mantei, A. y col., Eur. J. Immunol. 38:2616-2625 (2008)). Para ensayos de luciferasa, células HEK293T se transfectaron con tanto los
- 40
45
50
55

plásmidos indicadores como los dúplex de ARN pequeño usando Lipofectamine 2000 en un formato de 96 pocillos y se midió la actividad de luciferasa 24 h después.

5 Ensayos de luciferasa: Se mantuvieron 293T de riñón embrionario humano (HEK) (ATCC CRL-11268) en DMEM que contenía 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y penicilina/estreptomicina. Los 200 pb que rodean el sitio de unión de FOXP3 humano en el intrón 2 de SATB1 y la 3'UTR de SATB1 humana se amplificó usando PCR y se clonó en un vector psiCHECK II para generar psiCHECK II-SATB1-intrón 2, respectivamente psiCHECK II-SATB1-3'UTR. Estas construcciones (2 ng) se co-transfectaron por separado en células HEK293T en placas de 96 pocillos junto con 2 ng de plásmido de control o plásmidos que expresan FOXP3, respectivamente, un mimético de miARN para miR-155 o un miARN de control negativo. Se realizaron la lisis y el análisis 24 h después de la transfección usando el kit de luciferasa dual Promega. Se contó la actividad de luciferasa en un lector de placas Mithras (Berthold).

10 Transducciones de FOXP3: Linfocitos T_{conv} CD4⁺ humanos empobrecidos en T_{reg} se transdujeron lentiviralmente con pELNS YFP 2A FOXP3 o plásmidos de control que contenían GFP como se ha descrito previamente (Basu, S. y col., J. Immunol., 180:5794-5798 (2008)) y se evaluaron después de 72-120 h para la expresión de SATB1.

15 Secuenciación de bisulfito: Se aisló ADN genómico de linfocitos T_{reg} humanos y linfocitos T convencionales purificados por selección negativa usando CD4-RosetteSep (Stem Cell), seguido de clasificación en un clasificador de células FACSDiVa (Becton Dickinson) después de incubar las células con combinaciones de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo para CD4, CD25 y CD127 usando la extracción en fenol/cloroformo siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se realizó tratamiento del ADN genómico con bisulfato sódico produciendo la desaminación de citosinas no metiladas a uracilo, mientras que las citosinas metiladas siguieron invariables. Después de la amplificación se purificaron los productos de PCR y se secuenciaron en ambas direcciones.

20 Análisis estadístico: Se realizaron pruebas de Mann-Whitney y pruebas de la t de Student con el software SPSS 15.0.

25 Generación de anticuerpos: Un procedimiento para generar anticuerpos contra SATB1 implica administrar una célula presentadora de antígeno (APC) a animales, por ejemplo, ratón, rata, conejo, cabra. Esto produce la activación de linfocitos B para producir anticuerpos que reconocen linfocitos T_{reg} en un modo específico de SATB1. La APC puede pulsarse con SATB1 o un péptido de SATB1 que se une a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad.

30 Otro procedimiento incluye la generación de anticuerpos contra SATB1 administrando SATB1 o un péptido de SATB1 que se une a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad, que se procesa por una célula presentadora de antígeno que, a su vez, activa linfocitos B para producir anticuerpos que reconocen linfocitos T_{reg} en un modo específico de SATB1. El polipéptido de SATB1 o péptido de SATB1 usado en este procedimiento puede administrarse en asociación con un adyuvante.

35 Alternativamente, un procedimiento implica administrar una molécula de ácido nucleico que codifica SATB1 o un péptido de SATB1 que se une a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad. La molécula de ácido nucleico se expresa de manera que puede procesarse por células presentadoras de antígeno, que activan linfocitos B para producir anticuerpos que reconocen SATB1 en un modo específico de SATB1. La molécula de ácido nucleico que codifica SATB1 o un péptido de SATB1 puede estar presente en un vector de expresión.

40 Después de exponer un animal varias veces a linfocitos B de SATB1 del bazo o ganglios linfáticos, a continuación se fusionan con células tumorales de mieloma que pueden crecer indefinidamente en cultivo y que han perdido la capacidad para producir anticuerpos. Esta fusión se hace haciendo las membranas celulares más permeables por el uso de polietilenglicol o electroporación. Las células de hibridomas fusionadas se diluyen suficientemente para garantizar la clonalidad y crecimiento. Los anticuerpos de los diferentes clones se prueban a continuación para su capacidad para unirse al antígeno (por ejemplo, con una prueba tal como ELISA) o inmunotransferencia puntual, y se recoge el más sensible. A continuación se producen anticuerpos monoclonales en cultivo celular por, por ejemplo, cámaras de fermentación.

45 Otro procedimiento de generación de anticuerpos contra SATB1 implica el uso de SATB1 o un péptido de SATB1 para unir anticuerpos expresados por una biblioteca de fagos. Se expresan numerosos anticuerpos en la biblioteca como fusiones con la proteína de la envuelta de un bacteriófago, de manera que se expresan sobre la superficie de la partícula viral. El ADN extraído de fagos que interactúan contiene las secuencias de los anticuerpos específicos que reconocen SATB1 en un modo específico de SATB1.

Tabla 1: Expresión de SATB1

Nº	n	Tipo de célula donante	condición
1	4	sana	CD4+ 12 h cultivadas a continuación CD3CD28 activadas durante 8 h

ES 2 533 185 T3

2	4	sana	CD4+ 8 h CD3CD28 activadas
3	4	sana	CD4+ 8 h CD3CD28 activadas y TGFb1
(continuación)			
Nº	n	Tipo de célula donante	condición
4	4	sana	CD4+ 12 h cultivadas a continuación CD3CD28 activadas y TGFb1 durante 8 h
5	4	sana	CD4+ 8 h CD3CD28 activadas y VEGF
6	3	sana	CD4+ 12 h cultivadas a continuación CD3CD28 activadas y VEGF durante 8 h
7	4	sana	CD4+ 8 h CD3CD28 activadas e IL10
8	3	sana	CD4+ 12 h cultivadas a continuación CD3CD28 activadas e IL10 durante 8 h
9	4	sana	CD4+ 8 h CD3CD28 activadas y PGE2
10	4	sana	CD4+ 8 h CD3CD28 activadas y PD1
11	4	sana	CD4+ 8 h CD3CD28 activadas y CTLA4
12	4	sana	CD4+ 8 h CD3 activadas
13	3	sana	CD4+ 18 h cultivadas a continuación TGFb1 durante 1 h
14	3	sana	CD4+ 18 h cultivadas a continuación TGFb1 durante 2 h
15	3	sana	CD4+ 18 h cultivadas a continuación TGFb1 durante 8 h
16	4	sana	CD4+ 8 h cultivadas
17	4	sana	CD4+ 12 h cultivadas
18	3	sana	CD4+ 18 h cultivadas
19	3	sana	CD4+ 19 h cultivadas
20	6	sana	CD4+ 20 h cultivadas
21	3	sana	CD4+ 26 h cultivadas
22	4	sana	CD4+ 12 h cultivadas a continuación 1 ng/ml de TGFb1 durante 8 h
23	4	sana	CD4+ 12 h cultivadas a continuación 10 ng/ml de TGFb1 durante 8 h
24	3	sana	CD4+ 18 h TGFb1
25	7	sana	CD4+ sin tratar
26	4	sana	CD4+CD25- sin tratar
27	4	CLL	CD4+CD25- sin tratar
28	2	sana	CD4+CD25- sin tratar
29	2	sana	CD4+CD25- sin tratar
30	3	sana	CD4+CD25- 6 h cultivadas
31	4	sana	CD4+CD25- 24 h CD3/IL2 estimuladas
32	4	CLL	CD4+CD25- 24 h CD3/IL2 estimuladas
33	2	sana	CD4+CD25- sin tratar
34	3	sana	CD4+CD25bajoCD127+ sin tratar

ES 2 533 185 T3

35	3	sana	CD4+CD25-CD127+ sin tratar
36	4	sana	CD4+CD25-/bajoCD127+ sin tratar
(continuación)			
Nº	n	Tipo de célula donante	condición
37	4	CLL	CD4+CD25+ sin tratar
38	4	sana	CD4+CD25+ sin tratar
39	4	sana	CD4+CD25+ 24 h CD3/IL2 estimuladas
40	4	CLL	CD4+CD25+ 24 h CD3/IL2 estimuladas
41	4	sana	CD4+CD25+ sin tratar
42	2	sana	CD4+CD25+ sin tratar
43	2	sana	CD4+CD25+ 6 h cultivadas
44	4	sana	CD4+CD25+ expandidas
45	4	sana	CD4+CD25+ expandidas con rapamicina
46	4	sana	CD4+CD25+ expandidas y activación de 6 h a corto plazo de CD3CD28

Tabla 2: qPCR murina de cebadores

nombre	secuencia	SEC ID Nº
B-actina Directo	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	3
B-actina Inverso	ACCAGAGGCATACAGGGACA	4
Foxp3 Directo	ACCACACTTCATGCATCAGC	5
Foxp3 Inverso	CCAGTGGCAGCAGAAGGT	6
SATB1 Directo	AGGAGTGCCCCCTTTCAC	7
SATB1 Inverso	TGCTGCTGAGACATTTGCAT	8
IFNgamma Directo	CAGGAAGCGGAAAAGGAGT	9
IFNgamma Inverso	AAAATTCAAATAGTGCTGGCAGA	10
IL6 Directo	GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA	11
IL6 Inverso	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	12

5

Tabla 3: ChIP-PCR de cebadores

nombre	secuencia	SEC ID Nº:
Promotor de IL-7R Directo	CAGGGAATATCCAGGAGGAA	13
Promotor de IL-7R Inverso	TGTGTGAGCCAGTGTGTATGAA	14
Intrón 4 de IL-7R Directo	GAGGTGGCAGAAGAGTGGAG	15
Intrón 4 de IL-7R Inverso	TGCATCACACTGCAAACAAA	16
SATB1 Directo	GCAGTAGAAAGGTGGGTTCTTC	17

SATB1 Inverso	TGGTGACGAAAGAGAAATAAATG	18
SATB1 Directo	GAAAGGTGGGTTCTTCTGAAGATA	19
(continuación)		
nombre	secuencia	SEC ID N°:
SATB1 Inverso	GCAATGAATGCAGAATTACCTTT	20
Oligos de EMSA		
Sitio de unión de SATB1 Directo	GTATACAGTATGCAAACATAACTCACCATT	21
Sitio de unión de SATB1 Inverso	AATGGTGAGTTATGTTTGCATACTGTATAC	22
Sitio de unión de SATB1 (mut.) Directo	GTATACAGTATCGTCGAGCAACTCACCATT	23
Sitio de unión de SATB1 (mut.) Inverso	AATGGTGAGTTGCTCGACGATACTGTATAC	24
Competido del sitio de SATB1 Directo	TCAAAAATATTGAAGTGTTCACATACAC	25
Competido del sitio de SATB1 Inverso	GTGTATGTGATAACACTTCAATATTTTTGA	26

Tab. 4: qPCR humana de cebadores

nombre	secuencia	SEC ID NO
SATB1 Directo	CGATGAACTGAAACGAGCAG	27
SATB1 Inverso	CGGAGGATTTCTGAAAGCAA	28
Foxp3 Directo	ACCTACGCCACGCTCATC	29
Foxp3 Inverso	TCATTGAGTGCCGCTGCT	30
IL5 Directo	GGTTTGTTCAGCCAAAGAT	31
IL5 Inverso	TCTTGGCCCTCATTCTCACT	32
IFNgamma Directo	CACTGAAGAAATCTTTCAGGGAAT	33
IFNgamma Inverso	CCGTCTTCTTCTCCACACTTT	34

5 **Ejemplo 1:** Para identificar circuitos reguladores que participan en la inhibición mediada por FOXP3 de la diferenciación de linfocitos T_{efector}, se inició un gran experimento del transcriptoma que comprendió 171 muestras individuales en 48 condiciones humanas de linfocitos T FOXP3⁻ CD25⁻ convencionales (T_{conv}) en reposo o activados humanos y linfocitos T CD25⁺ FOXP3⁺ reguladores naturales (nT_{reg}) (Fig. 6 y Tabla 1). Como los miARN representan un nivel adicional de regulación génica, los presentes inventores realizaron el perfilado de microRNA (miARN) de 753 miARN humanos en T_{reg} frente a T_{conv} que permitió a los inventores calcular correlaciones inversas entre la expresión génica y la expresión de miARN (total de 35 x 10⁶ correlaciones). Se filtraron los genes 1) por su expresión diferencial entre muestras de T_{reg} y T_{conv}, 2) por una correlación inversa significativa entre la expresión génica y aquellos microARN significativamente enriquecidos en T_{reg}, y 3) por su ontología génica asociada a, por ejemplo, regulación transcripcional, metilación de ADN o modificación de histonas. De los 47 genes diferencialmente expresados entre T_{reg} y T_{conv}, la proteína 1 de unión a secuencias ricas en AT especial (SATB1) (Fig. 1a) estuvo entre los genes con la correlación inversa más significativa para un miARN particular, concretamente miR-155 (Fig. 1b), un miARN que se enriqueció significativamente en T_{reg} (Fig. 7). En clones de TH2 murinos, se ha mostrado que SATB1 sirve de regulador transcripcional global que se ancla específicamente a la topología de bucle del sitio de citocina TH2, un requisito previo para la inducción de ciertas citocinas TH2 (Cai, S. y col., Nat. Genet 38:1278-1288 (2006); Pipkin, M.E., Monticell, S., Immunology 124:23-32 (2008)). Como los miocitos deficientes en SATB1 no se desarrollan más allá del estadio positivo doble (Alvarez, J.D. y col., Genes dev. (14): 521-535 (2000); Cai, S. y col., Nat. Genet. 34:42-51 (2003)), la función de SATB1 en linfocitos T periféricos, particularmente en T_{reg}, es todavía imprecisa.

Se confirmó la expresión reducida de ARNm y de proteínas SATB1 en nT_{reg} para un conjunto mayor de muestras por qRT-PCR (Fig. 1c), transferencia Western (Fig. 1d) y citometría de flujo intracelular usando un mAAb para SATB1 directamente conjugado (Fig. 1e). En nT_{reg} , SATB1 puede regularse por señales exógenas tales como receptor de linfocitos T (TCR) y co-estimulación (aquí CD28), sin embargo la expresión nunca superó los niveles observados en T_{conv} en reposo (Fig. 1f). TGF β disminuye significativamente la expresión de SATB1 tanto en nT_{reg} como en T_{conv} , mientras que solo los T_{conv} estimulados, pero no nT_{reg} , expresaron citocinas TH1 y TH2 (Fig. 1f y Fig. 7). Como TGF β es el principal estímulo para la inducción de linfocitos T_{reg} adaptativos o inducidos (iT_{reg}) (Chen, W. y col., J. Exp. Med. 198:1875-1886 (2003)), los presentes inventores evaluaron la regulación de SATB1 bajo estas condiciones. Se estimularon linfocitos T CD25⁻ CD45RA⁺ humanos sin tratamiento previo mediante TCR y CD28 con o sin TGF β . Los linfocitos T estimulados en presencia de TGF β presentaron todos los distintivos de iT_{reg} , concretamente expresión significativa de ARNm de FOXP3 y función supresora de proteínas, además de linfocitos T (Fig. 8). Como se ha informado previamente por otros, la estimulación de TCR y CD28 (T_{estim}) también podría inducir la función de FOXP3 transitoria y supresora, sin embargo, esto fue variable y siempre inferior a iT_{reg} . A diferencia, cuando se evalúa la expresión de SATB1, solo se observó expresión significativamente potenciada en T_{estim} , pero no en iT_{reg} (Fig. 2a, b). La remodelación de cromatina mediada por SATB1 mediante la modificación de la acetilación de histonas y la ubicación de nucleosomas se ha ligado a transcripción reducida del gen de IL-2RA (Yasui, D. y col., Nature 419:641-645 (2002)). De acuerdo con estos hallazgos previos, los presentes inventores observan la mayor regulación por incremento de CD25 en iT_{reg} en ausencia de inducción de SATB1 (Fig. 2c). A diferencia, las citocinas TH1 y TH2 solo se producen en células con expresión de SATB1 significativamente elevada (Fig. 2d). Tomados conjuntamente, la reducción de la expresión de SATB1 parece ser un novedoso distintivo de tanto iT_{reg} como nT_{reg} en seres humanos.

La expresión de SATB1 también se redujo significativamente en T_{reg} murinos clasificados por flujo derivados de ratones DEREK (Lahl, K. y col., J. Exp. Med. 204:57-63 (2007)) (Fig. 3a, b y Fig. 9) sugiriendo la regulación conservada de SATB1 en T_{reg} . Estos hallazgos se soportaron adicionalmente por inmunohistoquímica de cuatro colores de tejido tímico que muestra la reducción de la expresión de SATB1 en T_{reg} *in vivo* (Fig. 3c). Incluso más sorprendente, ratones DEREK macho que alojan una FOXP3 mutada (DEREK x scurfy), mostraron una expresión de SATB1 significativamente elevada en T_{reg} (Fig. 3c, d). Estos hallazgos hicieron que los presentes inventores reanalizaran un análisis del transcriptoma previo (Williams, L.M. y col., Nat. Immunol 8:277-284 (2007)) en ratones transgénicos para un gen FOXP3 mutado en T_{reg} , que reveló una relación similar entre pérdida de función de FOXP3 y aumento de la expresión de SATB1 en T_{reg} murinos (Fig. 10). En ratones DEREK hembra heterocigóticos para el alelo scurfy mutado, los presentes inventores pudieron demostrar un aumento de la expresión de SATB1 en T_{reg} deficientes en FOXP3 en comparación con T_{reg} con FOXP3 intacto que soporta adicionalmente que la expresión de SATB1 es dependiente de FOXP3 en T_{reg} *in vivo* (Fig. 3e, f).

Después de establecer la reducción de la expresión de SATB1 en T_{reg} humanos y murinos *in vivo* e *in vitro*, los presentes inventores intentaron a continuación descubrir los mecanismos moleculares responsables de la reducción de la expresión de SATB1 en T_{reg} . Primero, los presentes inventores evaluaron el potencial de FOXP3 que reprime directamente SATB1. Una búsqueda de sitios de unión de FOXP3 conservados dentro del sitio genómico de SATB1 murina y humana reveló un motivo de FOXP3 dentro del segundo intrón (Fig. 4a y Fig. 11). El re-análisis del análisis de ChIP-Chip previamente informado de T_{reg} murinos (Zheng, Y. y col., Nature 445:936-940 (2007)) sugirió unión de FOXP3 significativo en esta región conservada dentro del sitio de SATB1 murina. Usando EMSA (ensayos de desplazamiento por movilidad electroforética, Fig. 4b) y un ChIP específico de FOXP3 (inmunoprecipitación de cromatina) (Fig. 4c), los presentes inventores pudieron demostrar la unión de FOXP3 al sitio de SATB1 *in vitro* e *in vivo* en nT_{reg} humanos altamente purificados. Para demostrar las consecuencias funcionales de la unión de FOXP3 al sitio de SATB1, los presentes inventores clonaron una construcción indicadora compuesta de los 180 pb del segundo intrón de SATB1 adyacente al sitio de unión de FOXP3 fusionado con un gen indicador de luciferasa. La expresión de esta construcción en células HEK293T produjo actividad de luciferasa constitutiva y la co-transfección de FOXP3 humana condujo a una disminución significativa en la actividad (Fig. 4d). Esta actividad de luciferasa reducida no se observó tras la mutación del sitio de unión de FOXP3.

Para evaluar la consecuencia del agotamiento de FOXP3 sobre la expresión de SATB1 en nT_{reg} humanos se realizaron experimentos de pérdida de función que silencian FOXP3 por ARNiP. Esto produjo una pérdida significativa de expresión de FOXP3 y función supresora de nT_{reg} (Fig. 12). Un aumento significativo de la expresión de SATB1 fue evidente en linfocitos nT_{reg} humanos agotados en FOXP3 (Fig. 4e), que fue acompañada de una inducción de citocinas TH1 (IFN- γ) y TH2 (IL-4 y IL-5) (Fig. 4f, g). De acuerdo con este hallazgo se observó un aumento de citocinas TH1 y TH2 *in vivo* en T_{reg} de ratones DEREK x scurfy (Fig. 13). La inactivación adicional de SATB1 en T_{reg} humanos con un gen FOXP3 silenciado produjo la disminución de la inducción de citocinas T colaboradoras (Fig. 4h) que indica que la liberación de citocinas $T_{efector}$ en T_{reg} deficientes en FOXP3 depende de SATB1.

Cuando se realizan experimentos de aumento de la función que expresan en exceso FOXP3 en linfocitos T_{conv} , se observó una expresión de SATB1 reducida que soporta adicionalmente el efecto regulador de FOXP3 sobre la expresión de SATB1 (Fig. 4i) que fue acompañada por una disminución concomitante en la expresión de ARNm de citocinas (Fig. 14). Juntos, estos hallazgos establecen que la reducción de la expresión de SATB1 no es solo un distintivo de T_{reg} , sino

una consecuencia de la inhibición directa por FOXP3. Se requiere la supresión de SATB1 mediada por FOXP3 para prevenir la expresión de citocinas T_{efector} en T_{reg} murinos y humanos.

Se evaluó el potencial de miR-155 para controlar la expresión de SATB1. miR-155 se ha asociado al desarrollo y diferenciación de linfocitos B y T normales, pero también a tumorigénesis (Rodríguez, A. y col., *Science* 316:608-611 (2007); Thai, T.H. y col., *Science* 316:604-608; Eis, P.S. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:3627-3632 (2005)). Más recientemente se sugirió una diana en la dirección 3' de FOXP3 (Zheng, Y. y col., *Nature* 445:936-940 (2007); Lu, L.F. y col., *Immunity* 30:80-91 (2009)). miR-155 se expresa altamente en linfocitos T humanos, particularmente en nT_{reg} (Fig. 5a), pero también en iT_{reg} (Fig. 15) (Cobb, B.S. y col., *J. Exp. Med.* 203:2519-2527 (2006)). La inactivación mediada por ARNip de FOXP3 en linfocitos T_{reg} humanos produjo una marcada disminución en la expresión de miR-155, mientras que la expresión en exceso de FOXP3 indujo la expresión de miR-155 que corrobora la regulación de miR-155 por FOXP3 (Fig. 16). La unión de sitios de la misma semilla se predijo computacionalmente usando miRBase Targets (Griffiths-Jones, S. y col., *Nucleic Acids Res.* 36:D154-158 (2008)), miRanda (Betel, D. y col., *Nucleic Acids Res.* 36:D149-153 (2008)), PicTar (Krek, A. y col., *Nat. Genet.* 37:495-500 (2005)) y TargetScan (Lewis, B.P. y col., *Cell* 115:787-798 (2003)) (Fig. 5b). Los presentes inventores fusionaron la 3' UTR de SATB1 con un gen indicador de luciferasa y determinaron la actividad de luciferasa en células 293T transfectadas con miR-155 sintético. La expresión en exceso de miR-155 reprimió significativamente la actividad de luciferasa, mientras que un miARN de control, que carece de un motivo de unión predicho, no tuvo efecto (Fig. 5c). A diferencia, la mutación del motivo de unión de miR-155 produjo una restauración de la actividad de luciferasa (Fig. 5c). Los experimentos de pérdida de función por inhibición mediada por oligonucleótidos antisentido de miR-155 en linfocitos T_{reg} humanos primarios conducen a un aumento significativo en la expresión de ARNm de SATB1 (Fig. 5d). En conjunto, la expresión de SATB1 no solo se reduce a un nivel transcripcional por unión directa de FOXP3 al sitio genómico de SATB1, sino que la reducida expresión se estabiliza adicionalmente por el miR-155 regulado por FOXP3.

Para estudiar la regulación epigenética del sitio de SATB1, se seleccionó una región específica para el análisis de metilación basado en la densidad de CpG que se alinea con los 1600 pares de bases del promotor de SATB1 predicho en la dirección 5' del exón 1. Como control, también se analizó el sitio bien descrito de metilación diferencial en el sitio de FOXP3 (Floess, S. y col., *PLoS Biol.* 5:e38 (2007); Baron, U. y col., *Eur. J. Immunol.* 37:2378-2389 (2007)) por secuenciación de bisulfito (Fig. 17). Aunque hubo una clara diferencia en la metilación del sitio de FOXP3 entre T_{reg} y T_{conv} , el sitio de SATB1 se desmetiló similarmente en ambos tipos de células (Fig. 5e). Este hallazgo soporta que la metilación de motivos CpG dentro de un elemento seleccionado del sitio de SATB1 no contribuye a la expresión impedida de SATB1 en linfocitos T_{reg} . Reanalizando un conjunto de datos de la secuenciación de ChIP para la metilación de histonas en subconjuntos de linfocitos T (Wei, G. y col., *Immunity* 30:155-167 (2009)), la trimetilación de H3 en el residuo de lisina 4 (H3K4me3), que es permisiva para la transcripción génica, fue detectable en iT_{reg} y nT_{reg} y adicionalmente elevada en linfocitos T y T_{efector} sin tratamiento previo. La trimetilación de H3 en el residuo de lisina 27 (H3K27me3), que se ha asociado al silenciamiento de genes, estuvo ausente en todo el subconjunto de linfocitos T (Fig. 18a, b). Tomados conjuntamente, la ausencia de silenciamiento de la metilación de histonas y de ADN es compatible con la accesibilidad del sitio de SATB1 para la transcripción de genes en T_{reg} .

En conclusión, se estableció la represión transcripcional mediada por FOXP3 y postranscripcional mediada por miR-155 del organizador de cromatina global SATB1 en iT_{reg} y nT_{reg} en el hombre y ratones (Fig. 19 y 20). Estos datos implican que los T_{reg} componen una red de circuitos reguladores continuamente activados que suprimen genes diana importantes, tales como SATB1, requeridos para la diferenciación de T_{efector} . Un bloqueo activo y continuo de la función de T_{efector} en lugar de la diferenciación terminal de T_{reg} permite a los linfocitos T un mayor grado de plasticidad. Esto podría ser particularmente interesante en situaciones en las que hay una inducción temporal de linfocitos T_{reg} adaptivos que puede obtener función de T_{efector} una vez FOXP3 se inactiva de nuevo. Datos recientes referentes a la regulación de factores de transcripción tales como IRF4 (Zheng, Y. y col., *Nature* (2009)) o la regulación epigenética de factores de transcripción asociados al linaje T (Wei, G. y col., *Immunity* 30:155-167 (2009)) también están de acuerdo con un modelo de redes reguladoras continuamente activas que moldea la función global de los linfocitos T en la periferia como una alternativa a la diferenciación terminal.

Ejemplo 2: Para identificar circuitos reguladores que participan en la inhibición mediada por FOXP3 de la diferenciación de T_{efector} , se realizó análisis del transcriptoma completo de linfocitos T FOXP3^{CD25} convencionales (T_{conv}) en reposo o activados humanos y linfocitos T CD25⁺FOXP3⁺ reguladores naturales (nT_{reg}) (Fig. 25 y Tabla 1). De los 47 genes que se diferencian específicamente entre T_{reg} y T_{conv} , la proteína 1 de unión a secuencias ricas en AT especiales (SATB1) (Fig. 21a) estuvo entre los genes que siempre se expresaron a niveles significativamente menores en T_{reg} en comparación con T_{conv} . La re-evaluación de los datos del transcriptoma de informes previos confirmó la observación de los inventores de que SATB1 era una posible diana de la expresión mediada por FOXP3 (Pfoertner, S. y col., *Genome Biol* 7, R54 (2006); Zheng, Y. y col., *Nature* 445, 936-940 (2007); Sugimoto, N. y col., *Int Immunol* 18, 1197-1209 (2006)). SATB1 es un factor de transcripción y el organizador de cromatina esencial para controlar un gran número de genes que participan en el desarrollo y la activación de linfocitos T (Alvarez, J. D. y col., *Genes Dev* 14, 521-535 (2000)). SATB1 regula la expresión génica reclutando directamente los factores de modificación de cromatina (Yasui, D. y col., *Nature* 419, 641-

645 (2002)) y anclando regiones de unión a la matriz a la matriz nuclear (Cai, S. y col., Nat Genet 34, 42-51 (2003)). En clones de TH2 murinos, se ha mostrado que SATB1 sirve de regulador transcripcional global que se ancla específicamente a la topología de bucle del sitio de citocinas TH2, un requisito previo para la inducción de ciertas citocinas TH2 (Cai, S. y col., Nat Genet 38, 1278-1288 (2006)). Como los timocitos deficientes en SATB1 no se desarrollan más allá del estadio positivo doble (Alvarez, J. D. y col. Genes Dev 14, 521-535 (2000); Cai, S. y col., Nat Genet 34, 42-51 (2003)), la función de SATB1 en linfocitos T periféricos, que incluye T_{reg} , es todavía imprecisa. A continuación, los presentes inventores validaron los datos del transcriptoma iniciales en un mayor conjunto de muestras por qRT-PCR (Fig. 21b), transferencia Western (Fig. 21c) y tinción intranuclear (Fig. 21d) y pudieron demostrar claramente la expresión reducida de ARNm y de proteínas de SATB1 en nT_{reg} humanos. Como el aumento en la expresión de SATB1 se asoció previamente a la activación /diferenciación de linfocitos T $CD4^+$ (Lund, R. y col., Eur J Immunol 35, 3307-3319 (2005)), los presentes inventores evaluaron la regulación de SATB1 en T_{conv} y T_{reg} durante la activación mediante el receptor de linfocitos T (usando mAb para CD3) en presencia de co-estimulación (mAb para CD28) o la citocina interleucina-2. El análisis de citometría de flujo de la expresión de SATB1 estableció una regulación por incremento dependiente de la estimulación de SATB1 en T_{conv} mientras que T_{reg} en reposo mostraron expresión de SATB1 significativamente menor y ausencia de regulación por incremento dependiente de la estimulación (Fig. 21e y Fig. 26).

Como $TGF\beta$ es un estímulo importante para la inducción de T_{reg} adaptivos o inducidos (iT_{reg}) (Chen, W. y col., J Exp Med 198, 1875-1886 (2003)), los presentes inventores evaluaron la regulación de SATB1 bajo estas condiciones. Se estimularon linfocitos T $CD25^+CD45RA^+$ humanos sin tratamiento previo mediante TCR y CD28 con o sin $TGF\beta$. Los linfocitos T estimulados en presencia de $TGF\beta$ presentaron los distintivos de iT_{reg} , concretamente significativa expresión de ARNm de FOXP3, y proteína, además de función supresora de linfocitos T (datos no mostrados). Como se ha informado previamente, la estimulación de TCR y CD28 (T_{estim}) también pudo inducir la expresión de FOXP3 transitoria y función supresora, sin embargo, esto fue variable y siempre inferior a iT_{reg} . A diferencia, cuando se evalúa la expresión de SATB1, solo se observó expresión significativamente potenciada en T_{estim} , pero no en iT_{reg} o linfocitos T sin tratamiento previo después de 5 días de cultivo (Fig. 21f, g). De acuerdo con esta observación, las citocinas TH1 y TH2 solo se producen en células con expresión de SATB1 significativamente elevada (Fig. 21h). Tomados conjuntamente, la expresión de SATB1 reducida parece ser un distintivo novedoso de tanto iT_{reg} como nT_{reg} en seres humanos.

A continuación, se evaluó la expresión de SATB1 en T_{reg} tímicos murinos en ratones que expresan GFP bajo el promotor de FOXP3 (Lahl, K. y col., J Exp Med 204, 57-63 (2007)) usando qPCR, transferencia Western, citometría de flujo y microscopía confocal. *In vivo*, la expresión de ARNm y de proteínas de SATB1 fue siempre inferior a T_{reg} (Fig. 21i-k y Fig. 27), sugiriendo regulación conservada de SATB1 en T_{reg} humanos y murinos. Similar a informes previos, los presentes inventores observaron localización nuclear de SATB1 en timocitos FOXP3⁺ que forman una estructura similar a jaula dentro del núcleo (Cai, S. y col., Nat Genet 34, 42-51 (2003)). En T_{reg} FOXP3⁺ GFP⁺, la localización y distribución de SATB1 fue comparable; sin embargo, la intensidad de fluorescencia fue siempre menor (Fig. 21j y Fig. 27c, d).

Para esclarecer adicionalmente SATB1 como posible gen diana de FOXP3, los presentes inventores analizaron T_{reg} de ratones DEREK macho que alojan un alelo FOXP3 espontáneamente mutado (DEREK x scurfy). Los T_{reg} clasificados por flujo de estos animales mostraron una expresión de SATB1 significativamente elevada en T_{reg} en comparación con T_{reg} competentes para FOXP3 (Fig. 21i). Estos hallazgos se validaron por la re-evaluación de tres conjuntos de datos del transcriptoma (GSE18387, GSE6681, GSE11775) (Williams, L. M. & Rudensky, A. Y., Nat Immunol 8, 277-284 (2007); Anz, D. y col., J Immunol 184, 939-946; Kuczma, M. y col., J Immunol 183, 3731-3741 (2009)) derivados de ratones con un gen FOXP3 mutado en T_{reg} (datos no mostrados). En general, la pérdida de función de FOXP3 se asoció a elevada expresión de SATB1 en estos sistemas de modelo murino. Para tratar adicionalmente la función del control de FOXP3 sobre la expresión de SATB1 en T_{reg} *in vivo*, los presentes inventores evaluaron la expresión de SATB1 en los llamados ' T_{reg} exFOXP3' introducidos por Bluestone y colaboradores (Zhou, X. y col., Nat Immunol 10, 1000-1007 (2009)). En este modelo murino, pueden identificarse células que han perdido la expresión de FOXP3 durante su periodo de vida y han recuperado función efectora. Cuando se evaluaron estos ' T_{reg} exFOXP3' bajo condiciones en reposo, la expresión de SATB1 fue todavía significativamente menor que en T_{conv} (datos no mostrados).

El control autónomo de células de SATB1 por FOXP3 se soportó adicionalmente por los hallazgos en ratones DEREK hembra heterocigóticos para el alelo scurfy mutado. Estos ratones alojan tanto T_{reg} con función de FOXP3 normal como T_{reg} con FOXP3 mutada. La evaluación al nivel de células individuales usando citometría de flujo y microscopía confocal reveló de nuevo el aumento de expresión de SATB1 en T_{reg} con FOXP3 mutada, pero no en T_{reg} que alojan FOXP3 normal (Fig. 22j, k).

La correlación inversa entre la expresión de FOXP3 y de SATB1 en linfocitos T_{reg} murinos y humanos sugirió fuertemente que FOXP3 podría actuar directamente de represor transcripcional del sitio de SATB1. Los presentes inventores realizaron matrices de baldosas FOXP3-ChIP de T_{reg} naturales humanos (Fig. 22a), además de predicción por ordenador bioinformática para identificar 8 lados para la validación de qPCR que se localizaron -5kb en la dirección 5' de TSS, además de en el sitio genómico de SATB1 (Fig. 22b). La unión de FOXP3 dentro de la región promotora o sitio genómico de SATB1 en T_{reg} se demostró por la PCR cuantitativa acoplada a ChIP (ChIP-qPCR) (Fig. 22c) y ensayos de

desplazamiento por movilidad electroforética (datos no mostrados). La afinidad de unión de FOXP3 se evaluó para los seis elementos de unión de FOXP3 más hacia 3' por estudios de interacción de ADN-proteína *in vitro* que revelan K_D entre x -y μ M (Fig. 22d). Se descartó unión no específica usando motivos de unión de FOXP3 mutados, que mostraron K_D significativamente mayores para la unión de FOXP3, soportando adicionalmente una unión específica de FOXP3 a numerosos sitios en el sitio de SATB1 genómico.

Para probar las consecuencias funcionales de la unión de FOXP3 al sitio de SATB1, se realizó un ensayo indicador de luciferasa para seis de las regiones de unión de FOXP3. Las regiones de unión de FOXP3 se clonaron entre un elemento promotor minP y un gen indicador de luciferasa. La expresión de estas construcciones produjo actividad de luciferasa y la co-transfección de FOXP3 humana condujo a una disminución significativa en la actividad para cinco de las seis regiones analizadas (Fig. 22e). El uso de los motivos de unión de FOXP3 mutados dentro de estas regiones rescató la disminución de la actividad de luciferasa (Fig. 22e), que indica que la expresión de SATB1 se reprime activamente uniendo FOXP3 a varios sitios de unión funcionales dentro del sitio de SATB1 genómico.

Para evaluar la consecuencia del agotamiento de FOXP3 sobre la expresión de SATB1 en nT_{reg} humanos, los presentes inventores realizaron primero experimentos de pérdida de función silenciando FOXP3 por ARNip. Esto produjo una pérdida significativa de la expresión de FOXP3 y función supresora de nT_{reg} (Fig. 28). Un aumento pequeño, pero significativo, de la expresión de SATB1 ya fue evidente en nT_{reg} humanos empobrecidos en FOXP3 no estimulados (Fig. 2f), pero esto se potenció significativamente cuando los T_{reg} se estimularon mediante TCR con co-estimulación o IL-2. Este aumento en la expresión de SATB1 fue acompañado de una inducción de citocinas TH1 (IFN- γ) y TH2 (IL-4 y IL-5) (Fig. 22 g, h). De acuerdo con este hallazgo, se observó un aumento de citocinas TH1 y TH2 *in vivo* en T_{reg} de ratones DREG x scurfy (Fig. 29). La inactivación adicional de SATB1 en T_{reg} humanos con un gen FOXP3 silenciado produjo una inducción significativamente reducida de citocinas T colaboradoras (Fig. 22i), que indica que la liberación de citocinas $T_{efector}$ en T_{reg} deficientes en FOXP3 depende de SATB1. Los experimentos de aumento de la función que expresan en exceso FOXP3 en T_{conv} produjeron una expresión reducida de SATB1 (Fig. 22j), que fue acompañada de una disminución concomitante en la expresión de ARNm de citocinas (Fig. 30). Juntos, estos hallazgos establecen que la reducción de la expresión de SATB1 no solo es un distintivo de T_{reg} , sino una consecuencia de la inhibición directa por FOXP3. Se requiere la supresión mediada por FOXP3 de SATB1 para prevenir la expresión de citocinas de $T_{efector}$ en T_{reg} murinos y humanos.

El bloqueo de citocinas de $T_{efector}$ es necesario, pero no suficiente, para que los T_{reg} ejerzan la función supresora. Para determinar si la supresión de SATB1 es necesaria para la función supresora de T_{reg} , los presentes inventores expresaron en exceso SATB1 en T_{reg} CD25^{alto} FOXP3⁺ naturales humanos y evaluaron la función supresora en comparación con T_{reg} transducidos con vector de control. A diferencia de T_{reg} transducidos con control, los linfocitos T_{reg} que expresan SATB1 pierden función supresora (Fig. 23a). Al mismo tiempo, estas células ganaron expresión de citocinas TH1 (IFN- γ) y TH2 (IL-4) (Fig. 23b), sugiriendo una reprogramación de linfocitos T_{reg} en $T_{efector}$ una vez se pierde la regulación de SATB1 en T_{reg} .

Para estimar los cambios globales en linfocitos T_{reg} que expresan en exceso SATB1, se realizó análisis del transcriptoma completo. Aumentaron significativamente un total de 100 genes en T_{reg} SATB1^{alto}, mientras que 21 disminuyeron (Fig. 23c). El análisis de notación cruzada de los genes diferencialmente expresados reveló que el 29 % de los genes cambiados se asociaron principalmente con la activación de linfocitos T, el 20 % se asociaron a la expresión en T_{conv} (en comparación con T_{reg}), el 16 % se clasificaron como genes de activación de T_{conv} . Los restantes genes (35 %) no mostraron asociación particular con la función o linaje de linfocitos T y se clasificaron como específicos de SATB1- (Fig. 23d). Además, los cambios de la evaluación transcripcional para el enriquecimiento de genes asociados a la diferenciación de TH1, TH2 y TH17 revelaron la inducción de muchos genes que participaron en la diferenciación de $T_{efector}$ en T_{reg} SATB1^{alto} (Fig. 23e).

Podría lograrse otro nivel de regulación de SATB1 por control epigenético del sitio de SATB1, por ejemplo, por metilación de ADN en sitios ricos en CpG. El análisis de densidad de CpG del sitio de SATB1 reveló tres sitios ricos en CpG en la dirección 5' del exón 1 (Fig. 24a) que se analizaron por secuenciación de bisulfito. El sitio de metilación diferencial en el sitio de FOXP3 (Floess, S. y col., PLoS Biol 5, e38 (2007)) se usó como control positivo (Fig. 31). Aunque hubo una clara diferencia en la metilación del sitio de FOXP3 entre T_{reg} y T_{conv} , el sitio de SATB1 se desmetiló similarmente en ambos tipos de células (Fig. 24a). Similarmente, cuando se analiza un conjunto de datos para la secuenciación de CHIP del genoma completo para la metilación de histonas en subconjuntos de linfocitos T (Zheng, Y. y col., Nature 445, 936-940 (2007)), la trimetilación de H3 en el residuo de lisina 4 (H3K4me3), permisivo para la transcripción génica, fue detectable en iT_{reg} y nT_{reg} en el sitio de SATB1 y se elevó adicionalmente en $T_{efector}$ (Fig. 32). La trimetilación de H3 en el residuo de lisina 27 (H3K27me3), que está asociado con el silenciamiento de genes, fue baja o estuvo ausente en todos los subconjuntos de linfocitos T (Fig. 32). La falta de silenciamiento de histonas y la metilación de ADN es compatible con la accesibilidad del sitio de SATB1 para la transcripción génica en T_{reg} .

Además de la supresión mediada por FOXP3 directa, los microARN (miARN) podrían representar un nivel postranscripcional adicional de la regulación génica que modula la expresión de SATB1 en T_{reg} humanos. La realización

del perfilado de miARN de 753 miARN humanos en T_{reg} frente a T_{conv} permitió establecer miARN diferencialmente expresados en T_{reg} y calcular correlaciones inversas entre la expresión de SATB1 génica y la expresión de miARN (Fig. 24a). Usando este enfoque, además de la predicción computacional de la unión de miARN de sitios de la misma semilla usando miRBase Targets, miRanda, PicTar y TargetScan (Fig. 24b), se identificaron 5 miARN que se expresaron diferencialmente entre T_{reg} y T_{conv} (Fig. 24c) que muestran una correlación inversa significativa entre la expresión de SATB1 y de miARN (Fig. 24d). De estos 5 miARN, miR-155, miR-21 y miR-7 son dianas directas de FOXP3 como se ha informado previamente para miR-155 (Zheng, Y. y col., Nature 445, 936-940 (2007); Lu, L. F. y col., Immunity 30, 80-91 (2009)) y miR-21 y confirmado por matrices de baldosas de FOXP3-ChIP (Fig. 24e), además de en análisis funcionales (Simon Barry, datos no publicados).

Par la evaluación de la unión funcionalmente relevante de los miARN a la 3' UTR de los ARNm de SATB1, los presentes inventores fusionaron la 3' UTR de SATB1 con un gen indicador de luciferasa y determinaron la actividad de luciferasa en células transfectadas con miARN sintéticos. La expresión de cualquiera de los 5 miARN reprimió significativamente la actividad de luciferasa constitutiva, mientras que un miARN de control, que carece de un motivo de unión en 3' UTR de SATB1, no tuvo efecto (Fig. 24f). La mutación de los motivos de unión respectivos produjo restauración de la actividad de luciferasa (Fig. 24f). A modo de ejemplo, los presentes inventores evaluaron a continuación el potencial de un único miARN, miR-155, para controlar la expresión de SATB1. Los experimentos de pérdida de función por inhibición mediada por oligonucleótidos antisentido de miR-155 en T_{reg} humanos primarios produjo solo diferencias menores en la expresión de ARNm de SATB1 (Fig. 33), indicando claramente que la pérdida de un único miARN no puede rescatar la expresión de SATB1. Sin embargo, la pérdida completa de todos los miARN, como se consigue en ratones por una delección de DICER específica de T_{reg} (Zhou (2008)), conduce claramente a regulación por incremento de SATB1 en tanto el nivel de ARNm como de proteína usando 2 modelos de ratón independientes (Fig. 24g y Fig. 34). Hasta la fecha, los datos de los presentes inventores muestran que la expresión de SATB1 se reduce en T_{reg} tanto por unión directa de FOXP3 al sitio genómico de SATB1 como unión de miARN regulados por FOXP3 a la 3' UTR del ARNm de SATB1.

En conclusión, se estableció la represión transcripcional mediada por FOXP3 y postranscripcional mediada por miARN del organizador de cromatina global SATB1 en iT_{reg} y nT_{reg} en seres humanos y ratones. Se requiere la represión de SATB1 para sostener la función supresora de T_{reg} y la inhibición de la función efectora en estas células (Fig. 36). Además, estos datos implican que T_{reg} componen una red de circuitos reguladores continuamente activados que suprimen genes diana importantes tales como SATB1 requerida para la diferenciación de $T_{efector}$. Un bloqueo activo y continuo de la función de $T_{efector}$ en lugar de la diferenciación de T_{reg} terminales permite a los linfocitos T un mayor grado de plasticidad. Esto podría ser particularmente interesante en situaciones en las que hay una inducción temporal de linfocitos T_{reg} adaptativos que pueden ganar función de $T_{efector}$ una vez FOXP3 se inactiva de nuevo (Zhou (2009)). Datos recientes referentes a la regulación de factores de transcripción tales como IRF4 (Zheng, Y. y col., Nature (2009)) o la regulación epigenética de factores de transcripción asociados al linaje de T (Wei, G. y col., Immunity 30, 155-167 (2009)) también están de acuerdo con un modelo de redes reguladoras continuamente activas que moldean la función global de linfocitos T en la periferia como una alternativa a la diferenciación terminal.

Listado de secuencias – Texto libre

SEC ID	Designación
1/2	>gij 33356175 ref NM_002971.2 homeocaja 1 de SATB de Homo sapiens (SATB1), ARNm y CDS
3-34	cebador
35-42	sitios de unión de FOXP3 en el sitio de SATB1 en varios mamíferos
43	sitio de unión de miR-155 humano

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universitaet Bonn Becton, Dickinson and Company

<120> Identificación de linfocitos T reguladores mediante el regulador del gen global SatB1

<130> 120944ep

<150> EP 10715520.2

<151> 06-04-2010

<150> US 61/165.970

5

<151> 02-04-2009

<160> 43

<170> PatentIn versión 3.3

10

<210> 1

<211> 3782

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<220>

<221> CDS

<222> (246) .. (2537)

20

<400> 1

ES 2 533 185 T3

ttctgccctt cccccgctta ggggggcggg ggtaggggaa aggaaaataa tacaatttca	60
ggggaagtgc ccttcaggtc tgctgctttt ttattttttt tttttaatta aaaaaaaaaa	120
ggacatagaa aacatcagtc ttgaacttct cttcaagaac cgggctgca aaggaaatct	180
cctttgtttt tgttatttat gtgctgtcaa gttttgaagt ggtgatcttt agacagtgac	240
tgagt atg gat cat ttg aac gag gca act cag ggg aaa gaa cat tca gaa	290
Met Asp His Leu Asn Glu Ala Thr Gln Gly Lys Glu His Ser Glu	
1 5 10 15	
atg tct aac aat gtg agt gat ccg aag ggt cca cca gcc aag att gcc	338
Met Ser Asn Asn Val Ser Asp Pro Lys Gly Pro Pro Ala Lys Ile Ala	
20 25 30	
cgc ctg gag cag aac ggg agc ccg cta gga aga gga agg ctt ggg agt	386
Arg Leu Glu Gln Asn Gly Ser Pro Leu Gly Arg Gly Arg Leu Gly Ser	
35 40 45	
aca ggt gca aaa atg cag gga gtg cct tta aaa cac tcg ggc cat ctg	434
Thr Gly Ala Lys Met Gln Gly Val Pro Leu Lys His Ser Gly His Leu	
50 55 60	
atg aaa acc aac ctt agg aaa gga acc atg ctg cca gtt ttc tgt gtg	482
Met Lys Thr Asn Leu Arg Lys Gly Thr Met Leu Pro Val Phe Cys Val	
65 70 75	
gtg gaa cat tat gaa aac gcc att gaa tat gat tgc aag gag gag cat	530
Val Glu His Tyr Glu Asn Ala Ile Glu Tyr Asp Cys Lys Glu Glu His	
80 85 90 95	
gca gaa ttt gtg ctg gtg aga aag gat atg ctt ttc aac cag ctg atc	578
Ala Glu Phe Val Leu Val Arg Lys Asp Met Leu Phe Asn Gln Leu Ile	

ES 2 533 185 T3

100					105					110					
gaa atg gca ttg ctg tct cta ggt tat tca cat agc tct gct gcc cag															626
Glu Met Ala Leu Leu Ser Leu Gly Tyr Ser His Ser Ser Ala Ala Gln															
			115					120					125		
gcc aaa ggg cta atc cag gtt gga aag tgg aat cca gtt cca ctg tct															674
Ala Lys Gly Leu Ile Gln Val Gly Lys Trp Asn Pro Val Pro Leu Ser															
		130					135						140		
tac gtg aca gat gcc cct gat gct aca gta gca gat atg ctt caa gat															722
Tyr Val Thr Asp Ala Pro Asp Ala Thr Val Ala Asp Met Leu Gln Asp															
		145				150						155			
gtg tat cat gtg gtc aca ttg aaa att cag tta cac agt tgc ccc aaa															770
Val Tyr His Val Val Thr Leu Lys Ile Gln Leu His Ser Cys Pro Lys															
		160			165				170					175	
cta gaa gac ttg cct ccc gaa caa tgg tgg cac acc aca gtg agg aat															818
Leu Glu Asp Leu Pro Pro Glu Gln Trp Ser His Thr Thr Val Arg Asn															
			180					185					190		
gct ctg aag gac tta ctg aaa gat atg aat cag agt tca ttg gcc aag															866
Ala Leu Lys Asp Leu Leu Lys Asp Met Asn Gln Ser Ser Leu Ala Lys															
			195				200						205		
gag tgc ccc ctt tca cag agt atg att tct tcc att gtg aac agt act															914
Glu Cys Pro Leu Ser Gln Ser Met Ile Ser Ser Ile Val Asn Ser Thr															
		210				215						220			
tac tat gca aat gtc tca gca gca aaa tgt caa gaa ttt gga agg tgg															962
Tyr Tyr Ala Asn Val Ser Ala Ala Lys Cys Gln Glu Phe Gly Arg Trp															
		225				230						235			
tac aaa cat ttc aag aag aca aaa gat atg atg gtt gaa atg gat agt															1010
Tyr Lys His Phe Lys Lys Thr Lys Asp Met Met Val Glu Met Asp Ser															
		240			245				250					255	
ctt tct gag cta tcc cag caa ggc gcc aat cat gtc aat ttt ggc cag															1058
Leu Ser Glu Leu Ser Gln Gln Gly Ala Asn His Val Asn Phe Gly Gln															
			260					265						270	
caa cca gtt cca ggg aac aca gcc gag cag cct cca tcc cct gcg cag															1106
Gln Pro Val Pro Gly Asn Thr Ala Glu Gln Pro Pro Ser Pro Ala Gln															
			275					280						285	
ctc tcc cat ggc agc cag ccc tct gtc cgg aca cct ctt cca aac ctg															1154
Leu Ser His Gly Ser Gln Pro Ser Val Arg Thr Pro Leu Pro Asn Leu															
		290					295							300	
cac cct ggg ctc gta tca aca cct atc agt cct caa ttg gtc aac cag															1202
His Pro Gly Leu Val Ser Thr Pro Ile Ser Pro Gln Leu Val Asn Gln															
		305			310							315			
cag ctg gtg atg gct cag ctg ctg aac cag cag tat gca gtg aat aga															1250
Gln Leu Val Met Ala Gln Leu Leu Asn Gln Gln Tyr Ala Val Asn Arg															
		320			325				330					335	
ctt tta gcc cag cag tcc tta aac caa caa tac ttg aac cac cct ccc															1298
Leu Leu Ala Gln Gln Ser Leu Asn Gln Gln Tyr Leu Asn His Pro Pro															
			340					345						350	
cct gtc agt aga tct atg aat aag cct ttg gag caa cag gtt tgg acc															1346
Pro Val Ser Arg Ser Met Asn Lys Pro Leu Glu Gln Gln Val Ser Thr															
			355					360						365	

ES 2 533 185 T3

aac aca gag gtg tct tcc gaa atc tac cag tgg gta cgc gat gaa ctg Asn Thr Glu Val Ser Ser Glu Ile Tyr Gln Trp Val Arg Asp Glu Leu 370 375 380	1394
aaa cga gca gga atc tcc cag gcg gta ttt gca cgt gtg gct ttt aac Lys Arg Ala Gly Ile Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn 385 390 395	1442
aga act cag ggc ttg ctt tca gaa atc ctc cga aag gaa gag gac ccc Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro 400 405 410 415	1490
aag act gca tcc cag tct ttg ctg gta aac ctt cgg gct atg cag aat Lys Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn 420 425 430	1538
ttc ttg cag tta ccg gaa gct gaa aga gac cga ata tac cag gac gaa Phe Leu Gln Leu Pro Glu Ala Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu 435 440 445	1586
agg gaa agg agc ttg aat gct gcc tcg gcc atg ggt cct gcc ccc ctc Arg Glu Arg Ser Leu Asn Ala Ala Ser Ala Met Gly Pro Ala Pro Leu 450 455 460	1634
atc agc aca cca ccc agc cgt cct ccc cag gtg aaa aca gct act att Ile Ser Thr Pro Pro Ser Arg Pro Pro Gln Val Lys Thr Ala Thr Ile 465 470 475	1682
gcc act gaa agg aat ggg aaa cca gag aac aat acc atg aac att aat Ala Thr Glu Arg Asn Gly Lys Pro Glu Asn Asn Thr Met Asn Ile Asn 480 485 490 495	1730
gct tcc att tat gat gag att cag cag gaa atg aag cgt gct aaa gtg Ala Ser Ile Tyr Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys Arg Ala Lys Val 500 505 510	1778
tct caa gca ctg ttt gca aag gtt gca gca acc aaa agc cag gga tgg Ser Gln Ala Leu Phe Ala Lys Val Ala Ala Thr Lys Ser Gln Gly Trp 515 520 525	1826
ttg tgc gag ctg tta cgc tgg aaa gaa gat cct tct cca gaa aac aga Leu Cys Glu Leu Leu Arg Trp Lys Glu Asp Pro Ser Pro Glu Asn Arg 530 535 540	1874
acc ctg tgg gag aac ctc tcc atg atc cga agg ttc ctc agt ctt cct Thr Leu Trp Glu Asn Leu Ser Met Ile Arg Arg Phe Leu Ser Leu Pro 545 550 555	1922
cag cca gaa cgt gat gcc att tat gaa cag gag agc aac gcg gtg cat Gln Pro Glu Arg Asp Ala Ile Tyr Glu Gln Glu Ser Asn Ala Val His 560 565 570 575	1970
cac cat ggc gac agg ccg ccc cac att atc cat gtt cca gca gag cag His His Gly Asp Arg Pro Pro His Ile Ile His Val Pro Ala Glu Gln 580 585 590	2018
att cag caa cag cag cag caa cag caa cag cag cag cag cag cag cag Ile Gln Gln 595 600 605	2066
gca ccg ccg cct cca cag cca cag cag cag cca cag aca ggc cct cgg Ala Pro Pro Pro Pro Gln Pro Gln Gln Gln Pro Gln Thr Gly Pro Arg 610 615 620	2114

ES 2 533 185 T3

ctc ccc cca cgg caa ccc acg gtg gcc tct cca gca gag tca gat gag 2162
 Leu Pro Pro Arg Gln Pro Thr Val Ala Ser Pro Ala Glu Ser Asp Glu
 625 630 635

gaa aac cga cag aag acc cgg cca cga aca aaa att tca gtg gaa gcc 2210
 Glu Asn Arg Gln Lys Thr Arg Pro Arg Thr Lys Ile Ser Val Glu Ala
 640 645 650 655

ttg gga atc ctc cag agt ttc ata caa gac gtg ggc ctg tac cct gac 2258
 Leu Gly Ile Leu Gln Ser Phe Ile Gln Asp Val Gly Leu Tyr Pro Asp
 660 665 670

gaa gag gcc atc cag act ctg tct gcc cag ctc gac ctt ccc aag tac 2306
 Glu Glu Ala Ile Gln Thr Leu Ser Ala Gln Leu Asp Leu Pro Lys Tyr
 675 680 685

acc atc atc aag ttc ttt cag aac cag cgg tac tat ctc aag cac cac 2354
 Thr Ile Ile Lys Phe Phe Gln Asn Gln Arg Tyr Tyr Leu Lys His His
 690 695 700

ggc aaa ctg aag gac aat tcc ggt tta gag gtc gat gtg gca gaa tat 2402
 Gly Lys Leu Lys Asp Asn Ser Gly Leu Glu Val Asp Val Ala Glu Tyr
 705 710 715

aaa gaa gag gag ctg ctg aag gat ttg gaa gag agt gtc caa gat aaa 2450
 Lys Glu Glu Glu Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Ser Val Gln Asp Lys
 720 725 730 735

aat act aac acc ctt ttt tca gtg aaa cta gaa gaa gag ctg tca gtg 2498
 Asn Thr Asn Thr Leu Phe Ser Val Lys Leu Glu Glu Glu Leu Ser Val
 740 745 750

gaa gga aac aca gac att aat act gat ttg aaa gac tga gataaaagta 2547
 Glu Gly Asn Thr Asp Ile Asn Thr Asp Leu Lys Asp
 755 760

tttgtttctg tcaacagtgc cactgttatt tactaacaaa atgaaaagtc caccttctct 2607

tctctcagaa aacctttggt gtctcattggt tggccaatga atcttcaaaa acttgccaaa 2667

acagaaaagt tggaaaagga taatacagac tgcaactaaat gtttctctct gttttacaaa 2727

ctgcttgcca gccccaggtg aagcatcaag gattgtttgg tattaaaatt tgtgttcacg 2787

ggatgcacca aagtgtgtac cccgtaagca tgaaaccagt gttttttggt ttttttttag 2847

ttcttattcc ggagcctcaa acaagcatta taccttctgt gattatgatt tcctctccta 2907

taattatttc tgtagcactc cacactgatc tttggaaact tgccccttat ttaaaaaaaa 2967

aaaagaaaa aaagagtttg ttactotatt gtatgttaca aaagaactat agactgtgga 3027

atgcagttta aagatgacat atgccacaaa atgcottgta ttatatggca ctgccgtaat 3087

tcaaatttgt ttttattttg gaaataaaag ttcaactgtac ttttttttca ttctcattgt 3147

tacatgattt tttaaaaaaa ggaaaagaaa atgtgaaaca caatttagtc ctcatattt 3207

attttagat cctgcagcat catgttgtaa ttaatttttt ggaagtttcc gttaaatgta 3267

atattgcttc tcttgttacc atactgattc ttttctattt ataatgtat tttgatgggc 3327

agtaaaacaa agtgtcttaa aagttttaa tagagaaat gtgctttaca cagttgccta 3387

taaaaagtgc tctatgttat ccaagcaatt catactataa gcttcaactct tattgttcta 3447

tgcaattttt actatcatgc aaataagctt aggtaaataa aactaataga tcacctaga 3507

aaattatgca attaatgtga aaataattga tgtttgcaat gtgtcttctt ttggtttaca 3567

atcaatttta aagctacatc tgtataaaat ttctgtataa aggtgtattt cttttttatg 3627

agtttatggc tatgaaaaca gctattttgt tacagctggc tgtttttata agtgtatcac 3687

aattttcttt atgcagaaat gttctgacta ggagtggtta ttgactgtaa ctacacaatt 3747

aaaattgttt gtatcgtaaa aaaaaaaaa aaaaa 3782

ES 2 533 185 T3

<210> 2

<211> 763

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 2

```

Met Asp His Leu Asn Glu Ala Thr Gln Gly Lys Glu His Ser Glu Met
 1           5           10           15

Ser Asn Asn Val Ser Asp Pro Lys Gly Pro Pro Ala Lys Ile Ala Arg
 20           25           30

Leu Glu Gln Asn Gly Ser Pro Leu Gly Arg Gly Arg Leu Gly Ser Thr
 35           40           45

Gly Ala Lys Met Gln Gly Val Pro Leu Lys His Ser Gly His Leu Met
 50           55           60

Lys Thr Asn Leu Arg Lys Gly Thr Met Leu Pro Val Phe Cys Val Val
 65           70           75           80

Glu His Tyr Glu Asn Ala Ile Glu Tyr Asp Cys Lys Glu Glu His Ala
 85           90           95

Glu Phe Val Leu Val Arg Lys Asp Met Leu Phe Asn Gln Leu Ile Glu
 100          105          110

Met Ala Leu Leu Ser Leu Gly Tyr Ser His Ser Ser Ala Ala Gln Ala
 115          120          125

Lys Gly Leu Ile Gln Val Gly Lys Trp Asn Pro Val Pro Leu Ser Tyr
 130          135          140

Val Thr Asp Ala Pro Asp Ala Thr Val Ala Asp Met Leu Gln Asp Val
 145          150          155          160

Tyr His Val Val Thr Leu Lys Ile Gln Leu His Ser Cys Pro Lys Leu
 165          170          175

```

ES 2 533 185 T3

Glu Asp Leu Pro Pro Glu Gln Trp Ser His Thr Thr Val Arg Asn Ala
 180 185 190

Leu Lys Asp Leu Leu Lys Asp Met Asn Gln Ser Ser Leu Ala Lys Glu
 195 200 205

Cys Pro Leu Ser Gln Ser Met Ile Ser Ser Ile Val Asn Ser Thr Tyr
 210 215 220

Tyr Ala Asn Val Ser Ala Ala Lys Cys Gln Glu Phe Gly Arg Trp Tyr
 225 230 235 240

Lys His Phe Lys Lys Thr Lys Asp Met Met Val Glu Met Asp Ser Leu
 245 250 255

Ser Glu Leu Ser Gln Gln Gly Ala Asn His Val Asn Phe Gly Gln Gln
 260 265 270

Pro Val Pro Gly Asn Thr Ala Glu Gln Pro Pro Ser Pro Ala Gln Leu
 275 280 285

Ser His Gly Ser Gln Pro Ser Val Arg Thr Pro Leu Pro Asn Leu His
 290 295 300

Pro Gly Leu Val Ser Thr Pro Ile Ser Pro Gln Leu Val Asn Gln Gln
 305 310 315 320

Leu Val Met Ala Gln Leu Leu Asn Gln Gln Tyr Ala Val Asn Arg Leu
 325 330 335

Leu Ala Gln Gln Ser Leu Asn Gln Gln Tyr Leu Asn His Pro Pro Pro
 340 345 350

Val Ser Arg Ser Met Asn Lys Pro Leu Glu Gln Gln Val Ser Thr Asn
 355 360 365

Thr Glu Val Ser Ser Glu Ile Tyr Gln Trp Val Arg Asp Glu Leu Lys
 370 375 380

Arg Ala Gly Ile Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg
 385 390 395 400

Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Lys
 405 410 415

Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe
 420 425 430

Leu Gln Leu Pro Glu Ala Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg

ES 2 533 185 T3

435	440	445																			
Glu	Arg	Ser	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Ala	Met	Gly	Pro	Ala	Pro	Leu	Ile						
450						455						460									
Ser	Thr	Pro	Pro	Ser	Arg	Pro	Pro	Gln	Val	Lys	Thr	Ala	Thr	Ile	Ala						
465						470						475									
Thr	Glu	Arg	Asn	Gly	Lys	Pro	Glu	Asn	Asn	Thr	Met	Asn	Ile	Asn	Ala						
				485						490											
Ser	Ile	Tyr	Asp	Glu	Ile	Gln	Gln	Glu	Met	Lys	Arg	Ala	Lys	Val	Ser						
			500						505												
Gln	Ala	Leu	Phe	Ala	Lys	Val	Ala	Ala	Thr	Lys	Ser	Gln	Gly	Trp	Leu						
			515						520												
Cys	Glu	Leu	Leu	Arg	Trp	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr						
		530						535					540								
Leu	Trp	Glu	Asn	Leu	Ser	Met	Ile	Arg	Arg	Phe	Leu	Ser	Leu	Pro	Gln						
		545						550					555								
Pro	Glu	Arg	Asp	Ala	Ile	Tyr	Glu	Gln	Glu	Ser	Asn	Ala	Val	His	His						
				565						570											
His	Gly	Asp	Arg	Pro	Pro	His	Ile	Ile	His	Val	Pro	Ala	Glu	Gln	Ile						
			580						585					590							
Gln	Ala																				
		595						600					605								
Pro	Pro	Pro	Pro	Gln	Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Thr	Gly	Pro	Arg	Leu						
		610						615					620								
Pro	Pro	Arg	Gln	Pro	Thr	Val	Ala	Ser	Pro	Ala	Glu	Ser	Asp	Glu	Glu						
		625						630					635								
Asn	Arg	Gln	Lys	Thr	Arg	Pro	Arg	Thr	Lys	Ile	Ser	Val	Glu	Ala	Leu						
				645						650											
Gly	Ile	Leu	Gln	Ser	Phe	Ile	Gln	Asp	Val	Gly	Leu	Tyr	Pro	Asp	Glu						
			660						665					670							
Glu	Ala	Ile	Gln	Thr	Leu	Ser	Ala	Gln	Leu	Asp	Leu	Pro	Lys	Tyr	Thr						
		675						680					685								
Ile	Ile	Lys	Phe	Phe	Gln	Asn	Gln	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Lys	His	His	Gly						
		690						695					700								

ES 2 533 185 T3

Lys Leu Lys Asp Asn Ser Gly Leu Glu Val Asp Val Ala Glu Tyr Lys
705 710 715 720

Glu Glu Glu Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Ser Val Gln Asp Lys Asn
725 730 735

Thr Asn Thr Leu Phe Ser Val Lys Leu Glu Glu Glu Leu Ser Val Glu
740 745 750

Gly Asn Thr Asp Ile Asn Thr Asp Leu Lys Asp
755 760

<210> 3

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 3

ctaaggccaa ccgtgaaaag 20

<210> 4

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> cebador

<400> 4

accagaggca tacagggaca 20

25 <210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
 <223> cebador

 <400> 5
 5 accacacttc atgcatcagc 20

 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 15 <400> 6
 ccagtggcag cagaaggt 18

 <210> 7
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 25 <400> 7
 aggagtgccc cctttcac 18

 <210> 8
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> cebador

<400> 8
 tgctgctgag acatttgcac 20

<210> 9
 5 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> cebador

<400> 9
 caggaagcgg aaaaggagt 19

15 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 10
 aaaattcaaa tagtgctggc aga 23

25 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 11
 35 gctaccaaac tggatataat cagga 25

<210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> cebador
<400> 12
10 ccaggtagct atgtactcc agaa 24
<210> 13
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
20 <400> 13
caggaatat ccaggaggaa 20
<210> 14
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
30 <400> 14
tgtgtgagcc agtgtgatg aa 22
<210> 15
35 <211> 20

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> cebador

<400> 15
gaggtggcag aagagtgag 20

10 <210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 16
20 tgcatcacac tgcaaacaaa 20

<210> 17
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> cebador

<400> 17
30 gcagtagaaa ggtgggttct tc 22

<210> 18
<211> 23
<212> ADN
35 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

 <400> 18
 5 tggtgacgaa agagaaataa atg 23

 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 15 <400> 19
 gaaaggtggg ttctctgaa gata 24

 <210> 20
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 25

 <400> 20
 gcaatgaatg cagaattacc tt 23

 <210> 21
 30 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> cebador

<400> 21
 gtatacagta tgcaaacata actcaccatt 30

<210> 22
 5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> cebador

<400> 22
 aatggtgagt tatgttgca tactgtatac 30

15 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 23
 gtatacagta tcgtcgagca actcaccatt 30

25 <210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 24
 35 aatggtgagt tgctcgacga tactgtatac 30

<210> 25
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> cebador
<400> 25
10 tcaaaaatat tgaagtgta tcacatacac 30
<210> 26
<211> 30
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
20 <400> 26
gtgtatgtga taacactca atattttga 30
<210> 27
<211> 20
25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
30 <400> 27
cgatgaactg aaacgagcag 20
<210> 28
35 <211> 20

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> cebador

<400> 28
cggaggattt ctgaaagcaa 20

10 <210> 29
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 29
acctacgcca cgctcatc 18

20 <210> 30
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> cebador

<400> 30
30 tcattgagtg tccgctgct 19

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
35 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

 <400> 31
 5 ggtttgtgc agccaaagat 20

 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador

 15 <400> 32
 tcttggcct cattctcact 20

 <210> 33
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 25
 <400> 33
 cactgaagaa atcttcagg gaat 24

 <210> 34
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> cebador

ES 2 533 185 T3

<400> 34
ccgtctttct tctccacact tt 22

<210> 35
5 <211> 55
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 35
10 ataatgggtg agttatggtt gcatactgta tactactcat agcaaattag agaag 55

<210> 36
<211> 55
<212> ADN
15 <213> Pan troglodytes

<400> 36
ataaatagtg agttatggtt gcatactgta tactactcgt agcaaattag agaag 55

20 <210> 37
<211> 50
<212> ADN
<213> Mus musculus

25 <400> 37
acaactgcag tgggttctgt ttgcgtagca gttaaagcaa atcagaccag 50

<210> 38
<211> 57
30 <212> ADN
<213> Rattus norvegicus

<400> 38
acaagtgcag agggttctgt ttgcgttctg ttagcagtt agagcaaadc agaccag 57
35

ES 2 533 185 T3

<210> 39
<211> 57
<212> ADN
<213> Canis familiaris
5
<400> 39
acgcctatag tgagttctgt ttgcaccctg aataccactc acagcagatc agataag 57

<210> 40
10 <211> 57
<212> ADN
<213> Bos taurus

<400> 40
15 ccgagctgag tgaattacat ttgcacacca ggtaccactc acagcagatc agaccag 57

<210> 41
<211> 60
<212> ADN
20 <213> Gallus gallus

<400> 41
acatctgcag tgtgtattta ggttctogtg ctgctgcta ctacaacaa atcaggcagg 60

<210> 42
<211> 12
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> consenso de FOXP3

<400> 42
ttatgttgc at 12
35

<210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 43

tgagttatgt ttgcatactg 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de linfocitos T reguladores inestables en una población de linfocitos T reguladores que tiene el potencial de conversión en funcionalidad de linfocitos T efectores, procedimiento que comprende detectar células con niveles elevados de expresión de proteínas SATB1 en la población de linfocitos T.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células con niveles elevados de expresión de proteínas SATB1 en la población de linfocitos T son detectadas mediante un procedimiento que comprende
 - (a) poner en contacto la población de células con uno o más ligandos que se unen específicamente a SATB1, y
 - (b) identificar los linfocitos T reguladores en la población de células debido a una reducción significativa de la unión con los ligandos de unión a SATB1 en comparación con la unión de dichos ligandos con las otras células en la
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, que es adecuado para el control de calidad de poblaciones de linfocitos T reguladores.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que los ligandos son anticuerpos o fragmentos de los mismos, preferentemente los ligandos son anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 2 ó 4, en el que los ligandos/anticuerpos llevan restos funcionales que incluyen, pero no se limitan a, marcas, colorantes y toxinas.
6. El procedimiento de la reivindicación 2, 4 ó 5, en el que la población de células está seleccionada de cultivo celular, sangre completa y fracciones de sangre completa y/o la población de células comprende células de mamífero que incluyen células humanas.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende además poner en contacto la población de células humanas con uno o más ligandos que se unen específicamente a CD4, CD25 y/o CD127 sobre los linfocitos T.
8. El procedimiento de la reivindicación 6 ó 7, que comprende además ensayar la expresión de FOXP3.
9. Uso del ligando, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 2, 4 ó 5 para identificar linfocitos T reguladores inestables en una población de células.

25

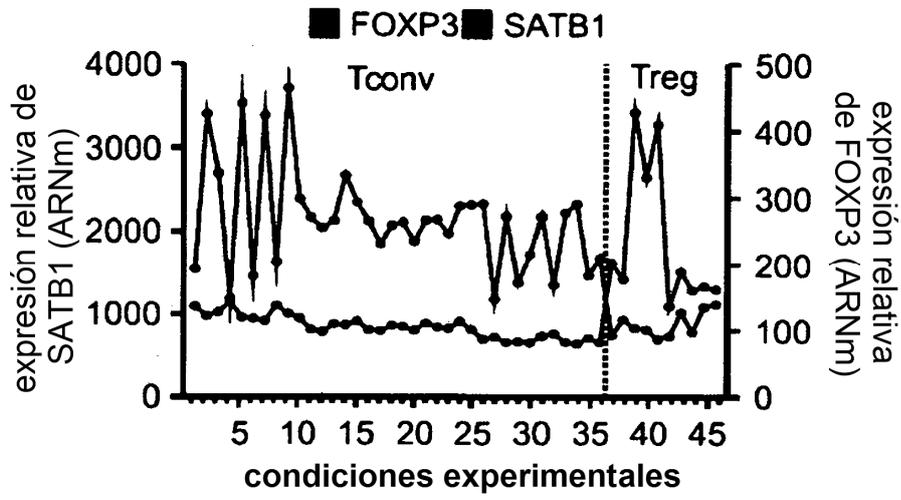


Fig.1a

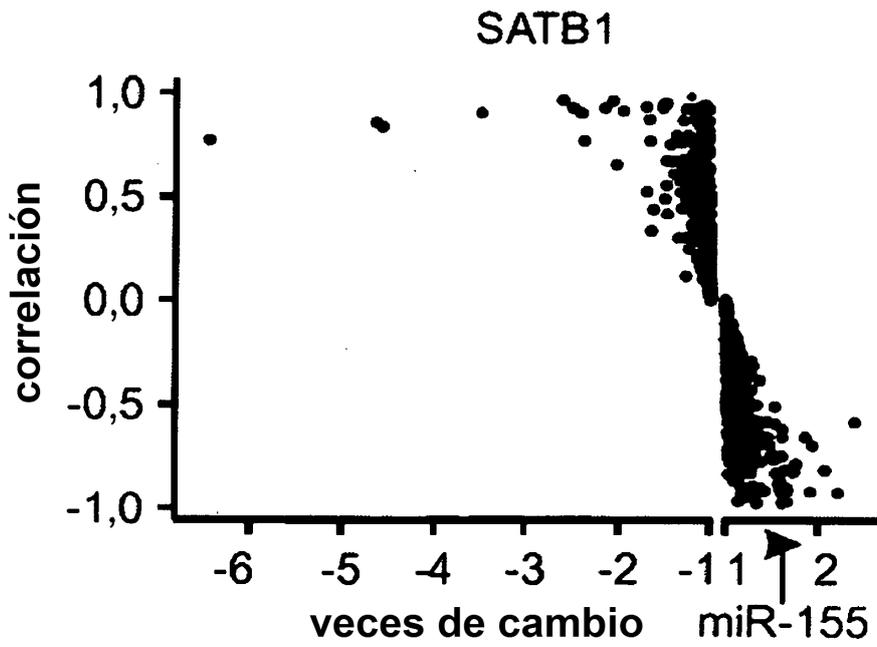


Fig.1b

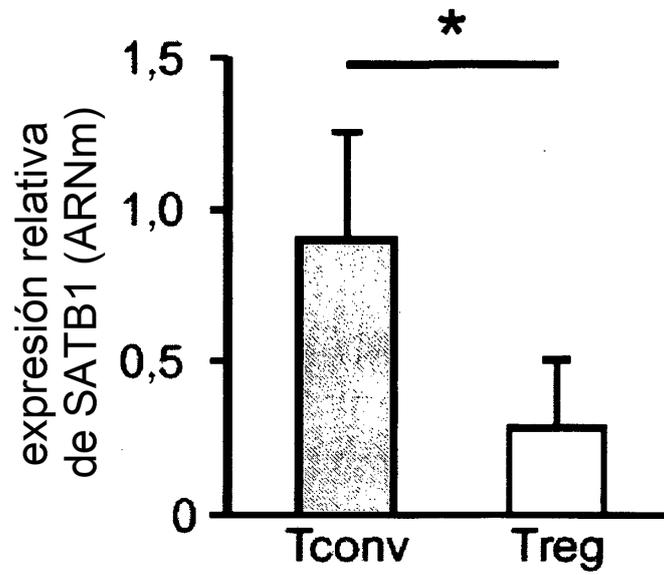


Fig.1c

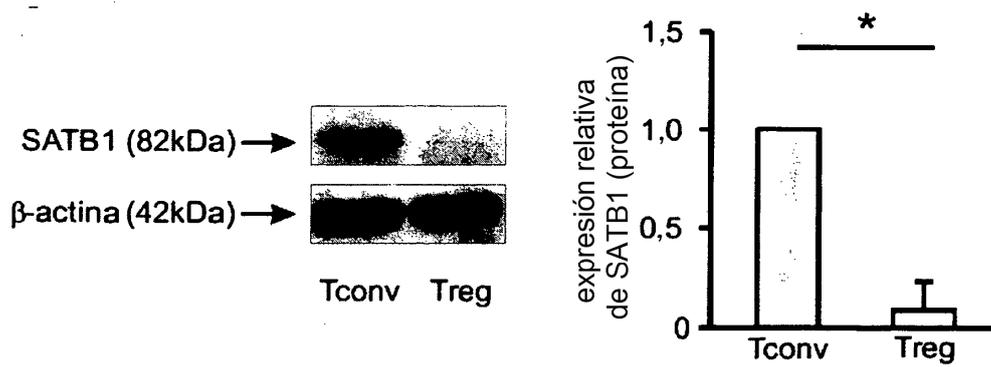


Fig.1d

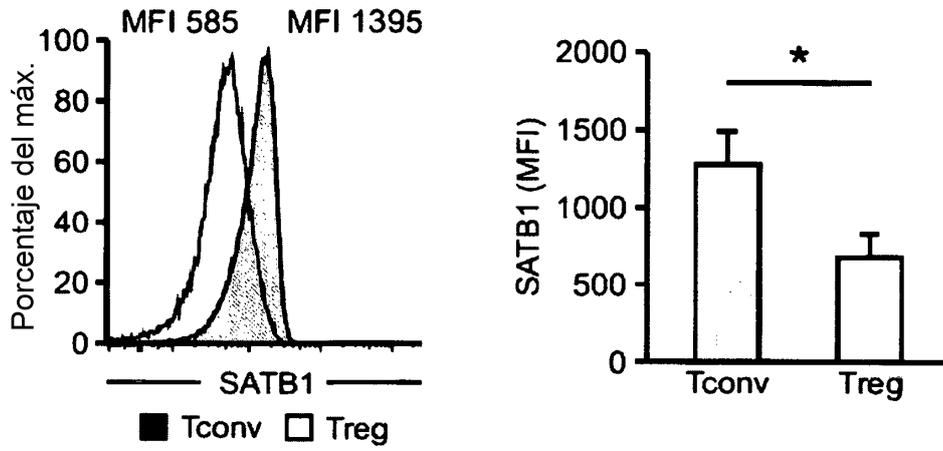


Fig.1e

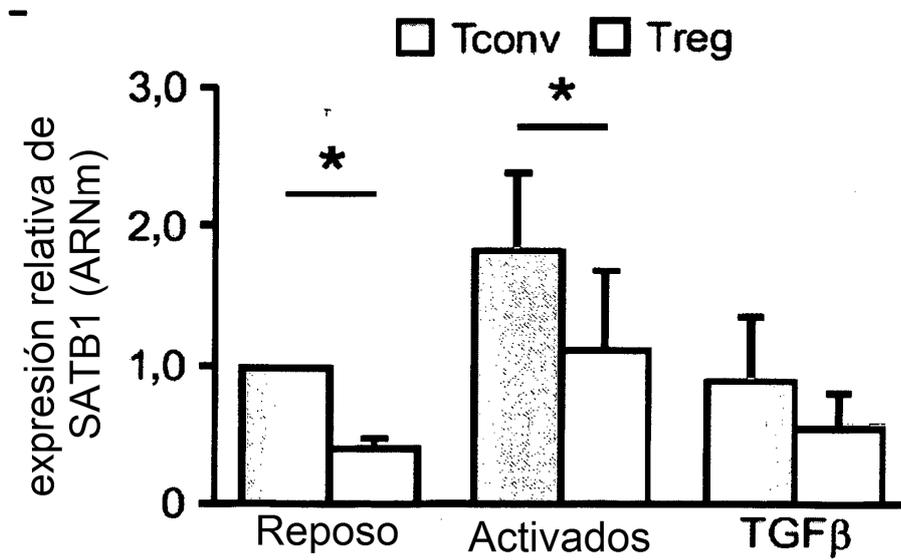


Fig.1f

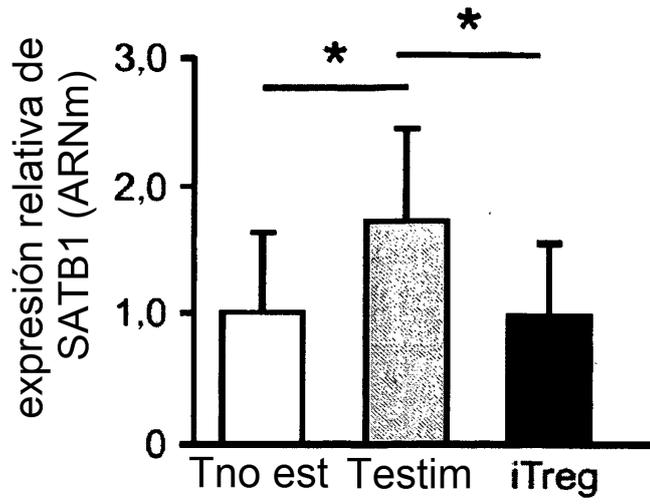


Fig.2a

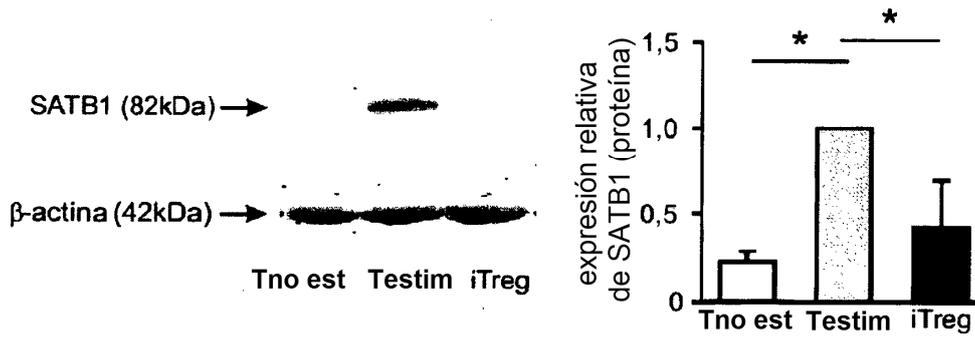


Fig.2b

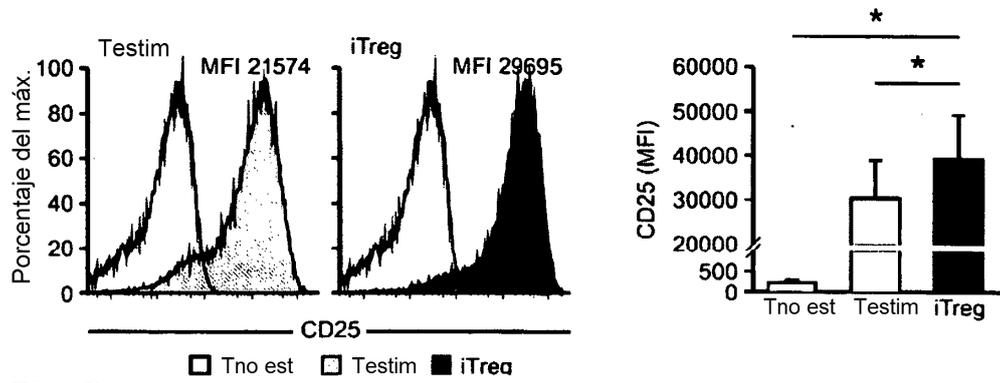


Fig.2c

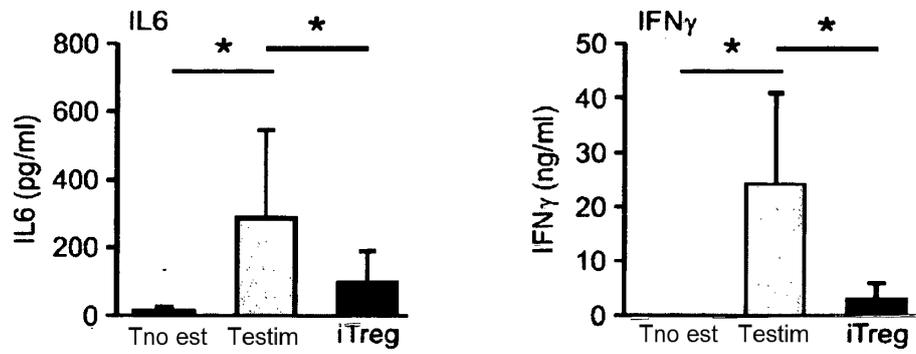


Fig.2d

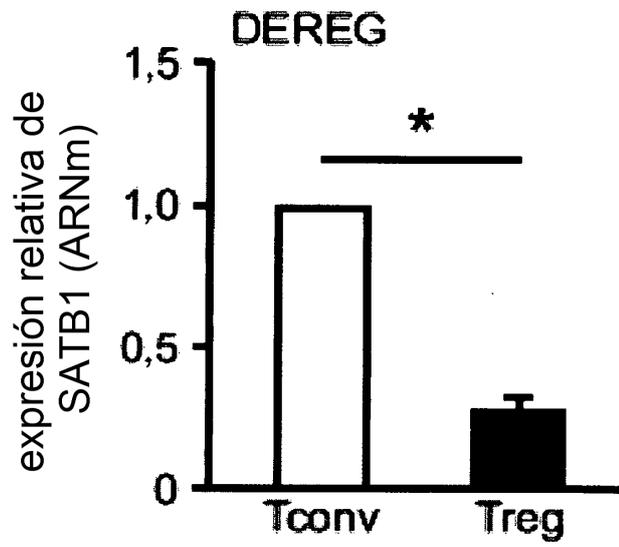


Fig.3a

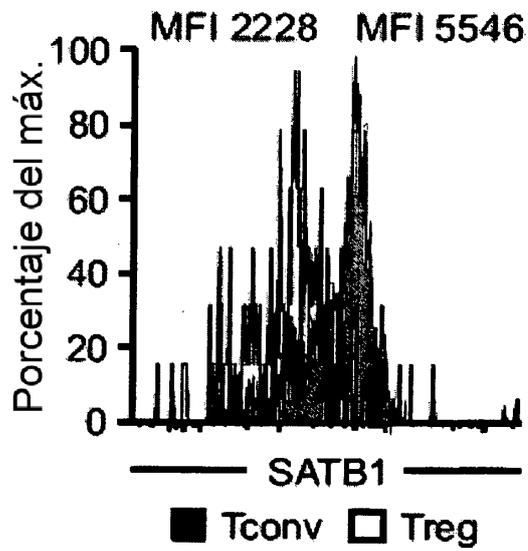


Fig.3b

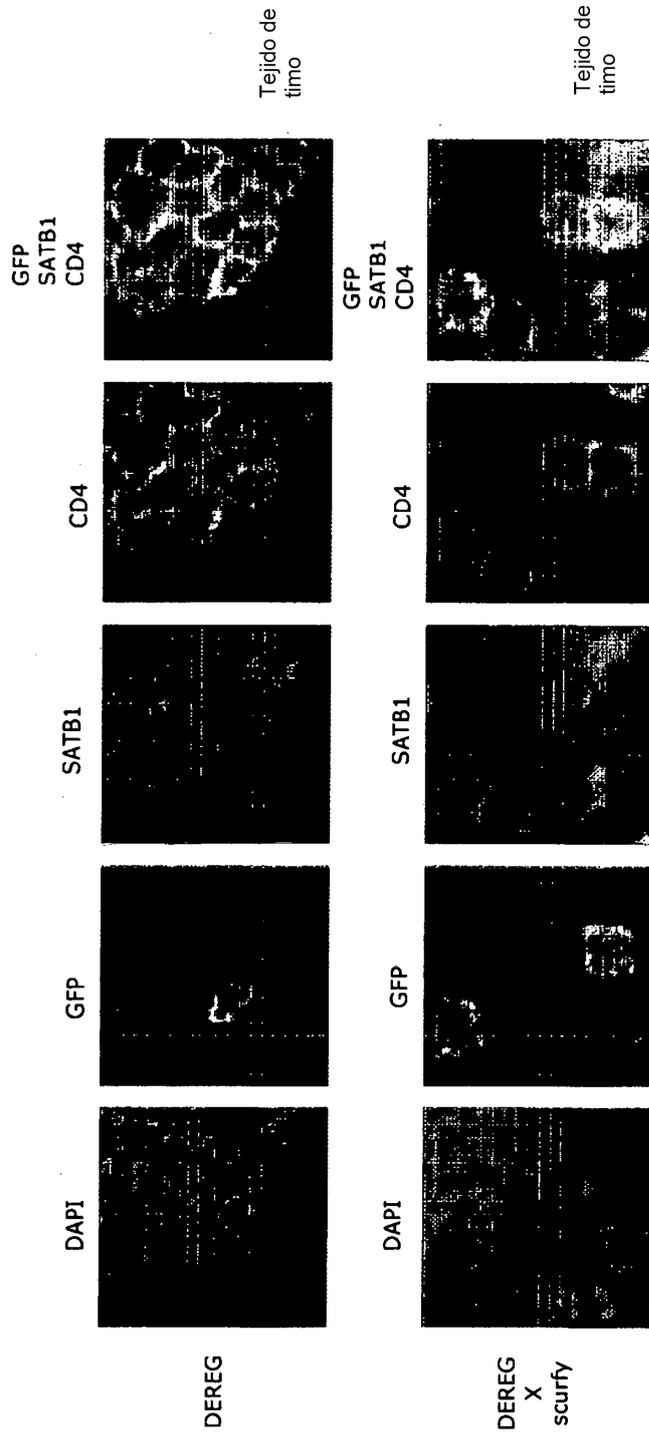


Fig.3c

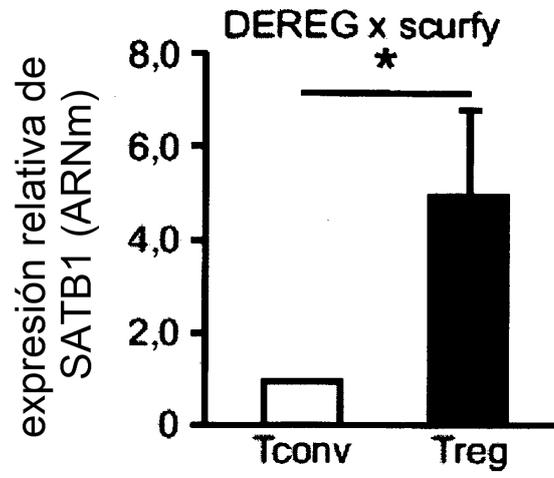


Fig.3d

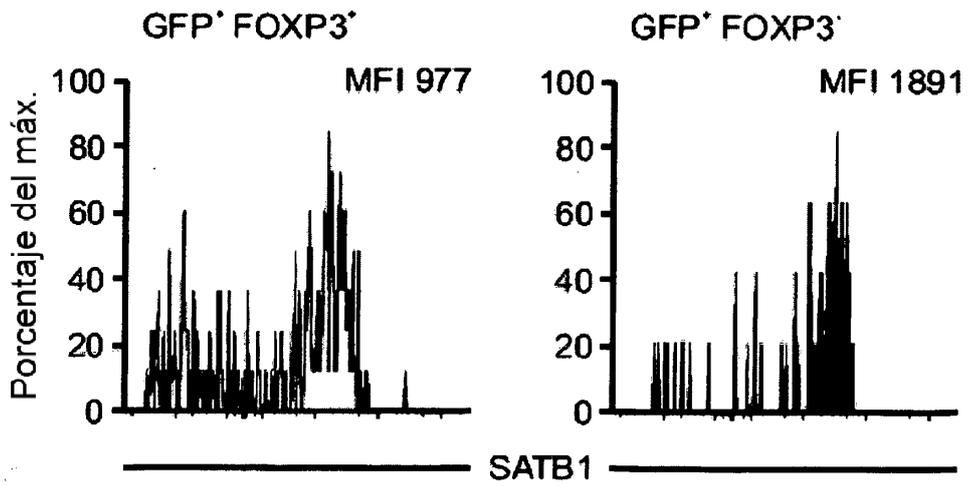


Fig.3e

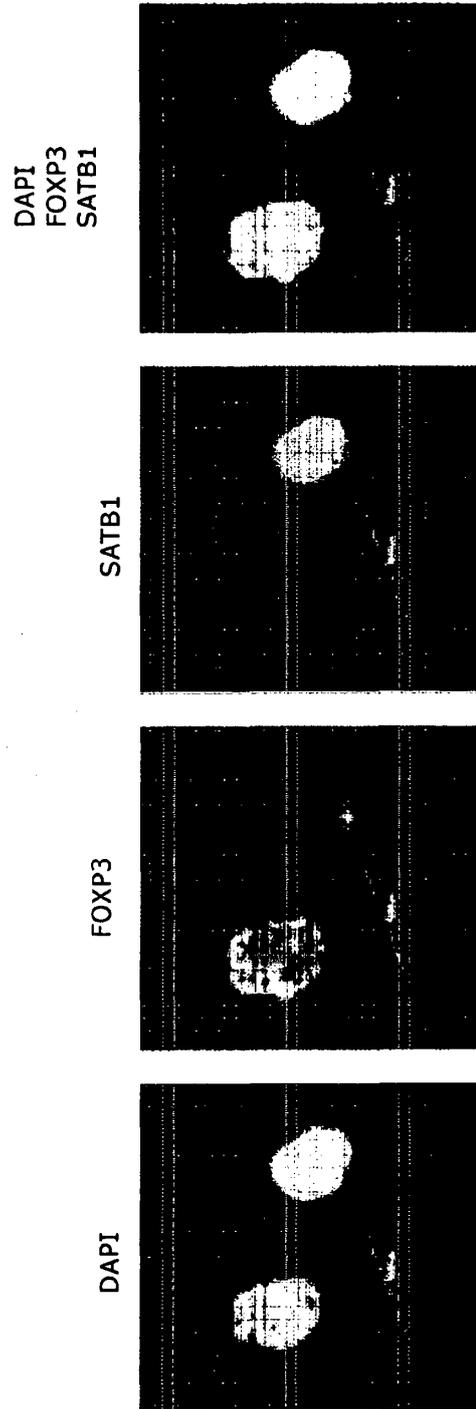


Fig.3f

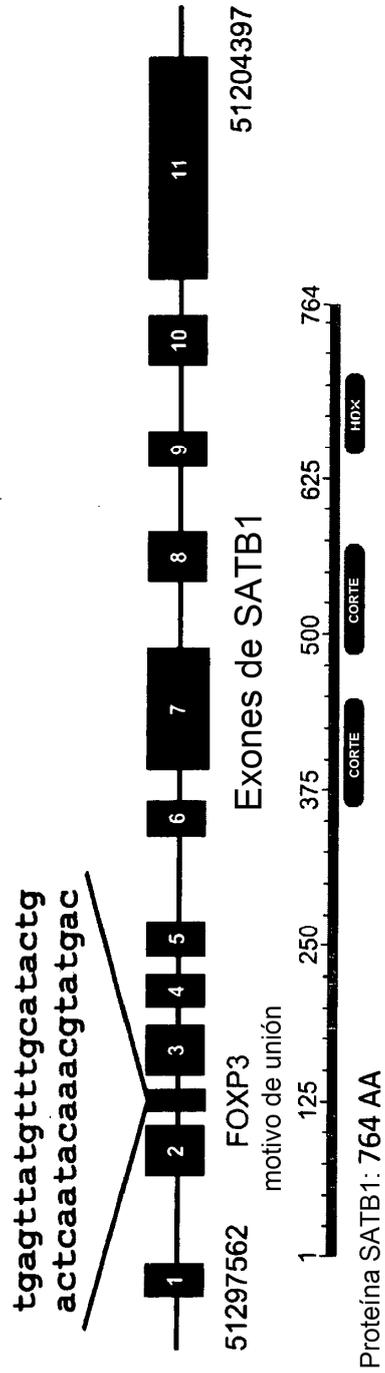
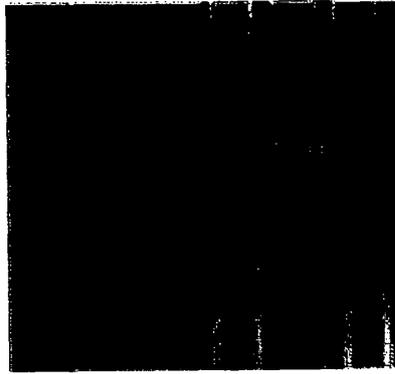


Fig.4a



-	-	+	+	+	+	Extracto nuclear de Treg
+	-	+	-	+	+	oligo de SATB1
-	+	-	+	-	+	oligo de FKH
-	-	-	-	+	-	oligo de mSATB1

Fig.4b

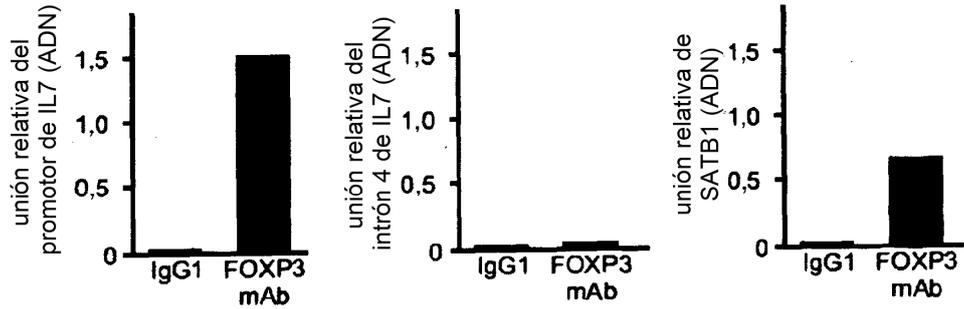


Fig.4c

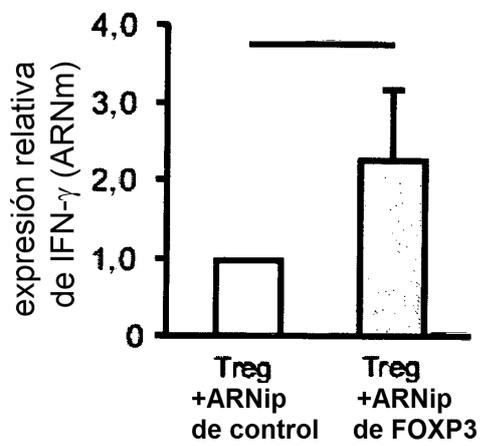
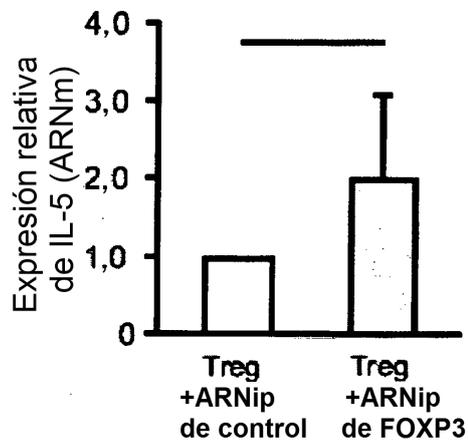
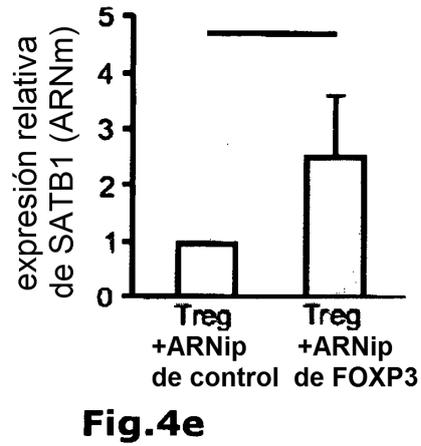
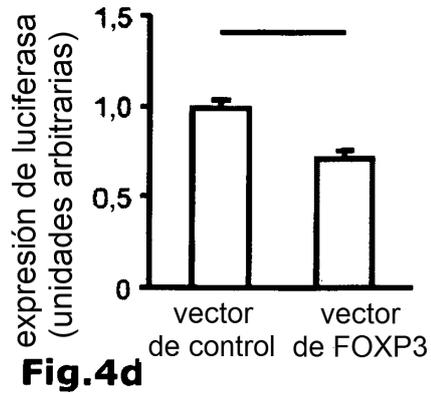
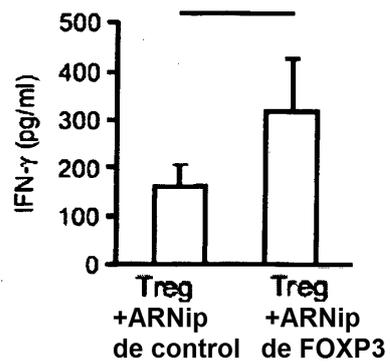
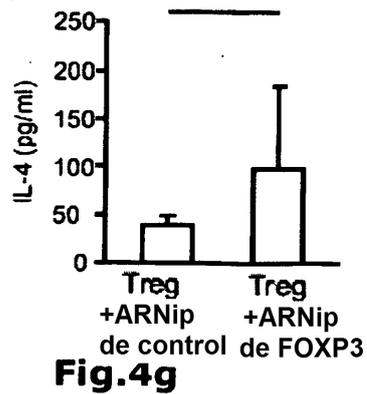


Fig.4f



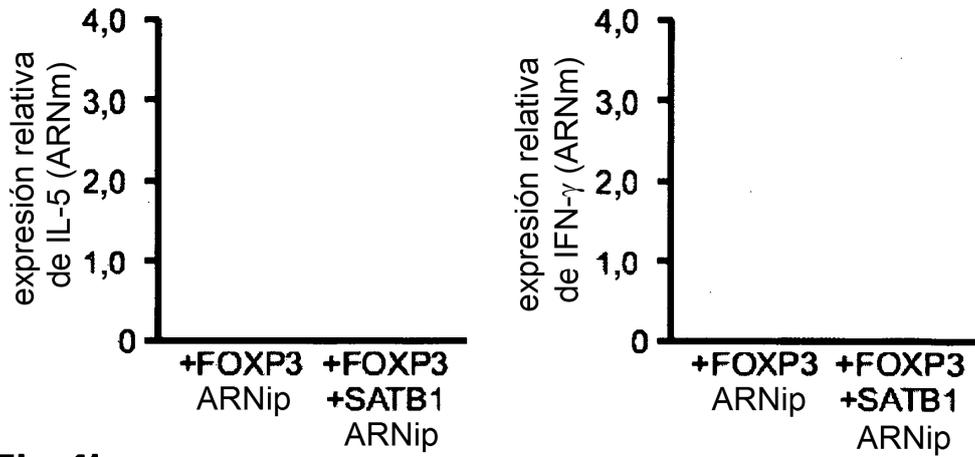


Fig.4h

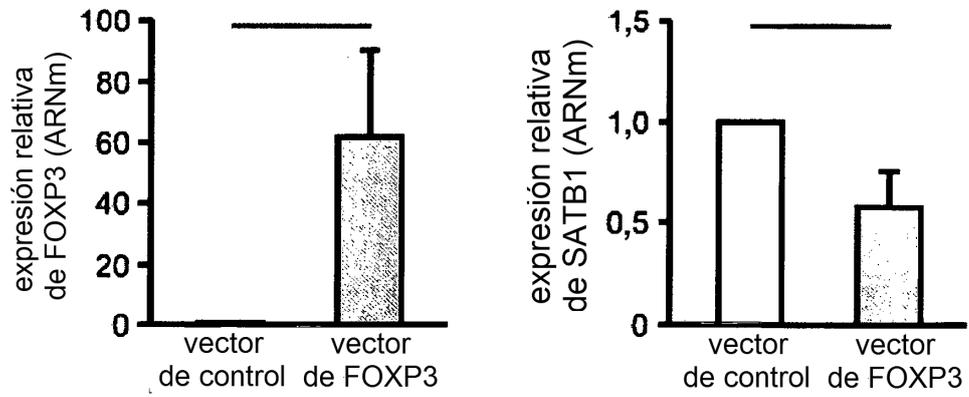


Fig.4i

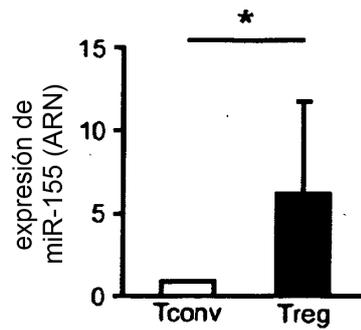


Fig.5a

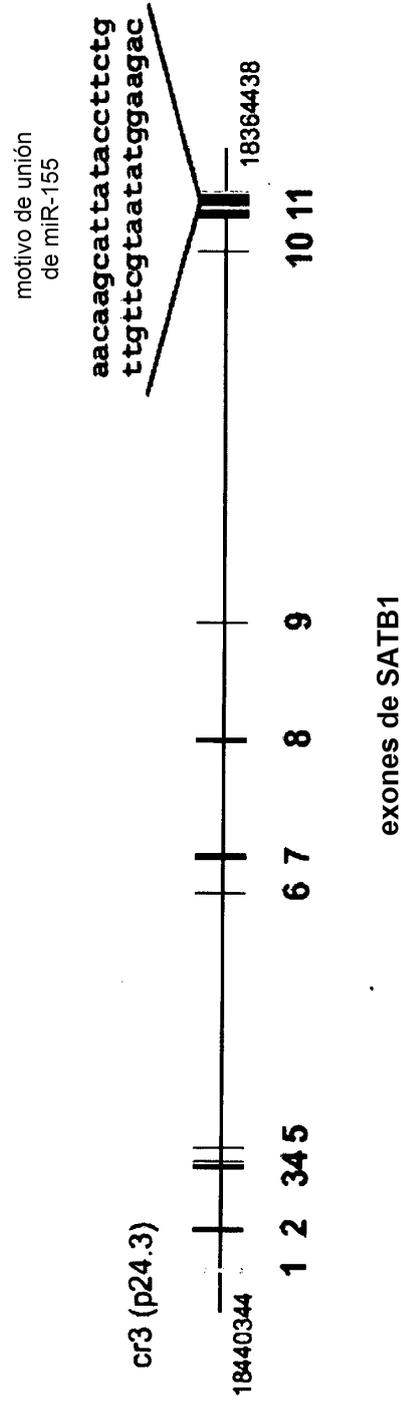


Fig.5b

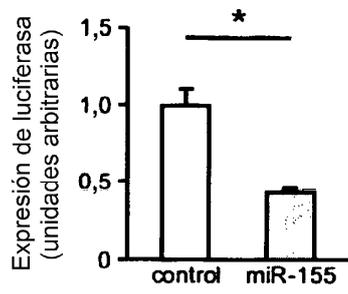


Fig.5c

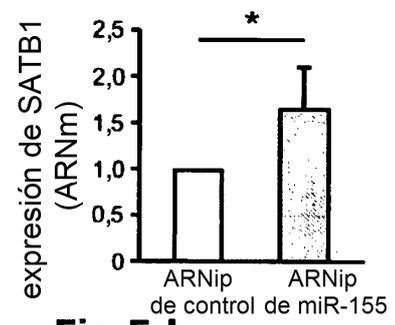


Fig.5d

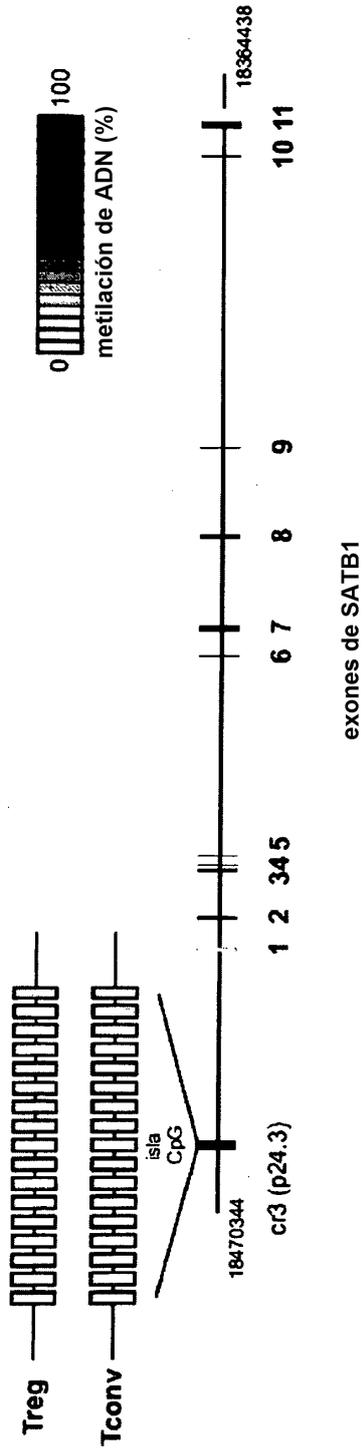


Fig.5e

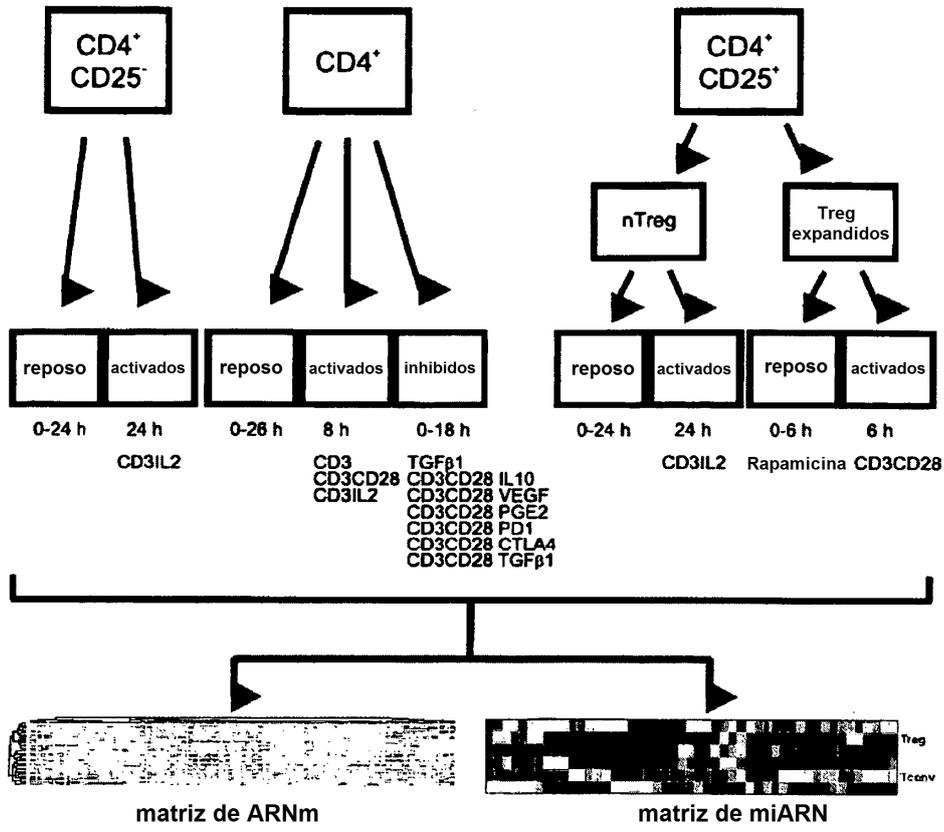


Fig.6

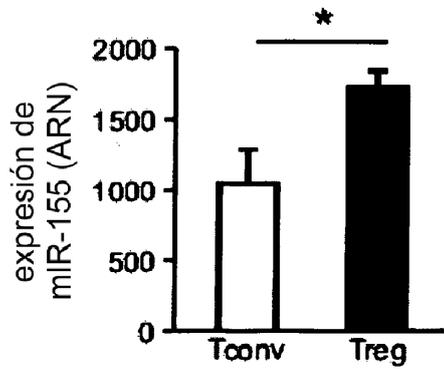


Fig.7

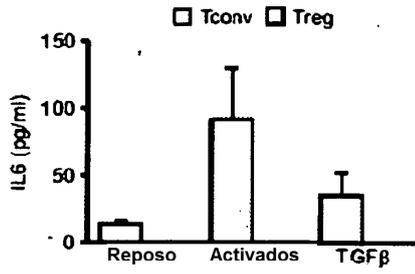


Fig.8a

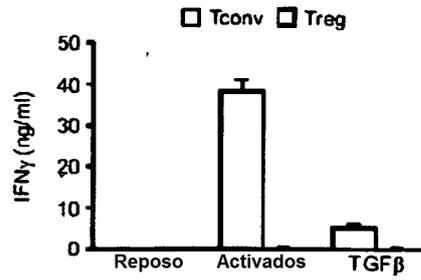


Fig.8b

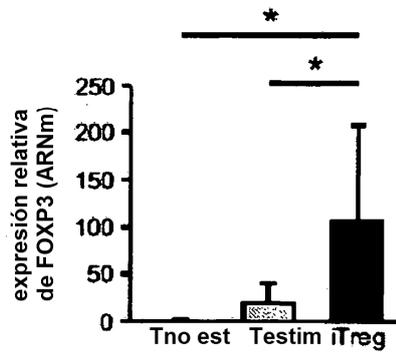


Fig.9a

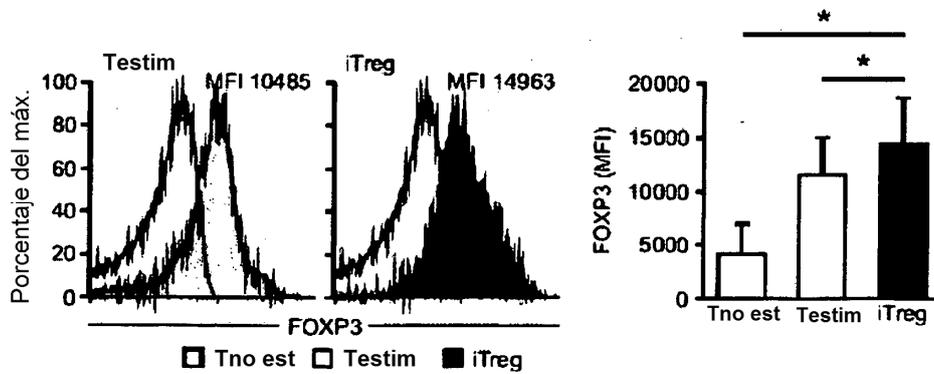


Fig.9b

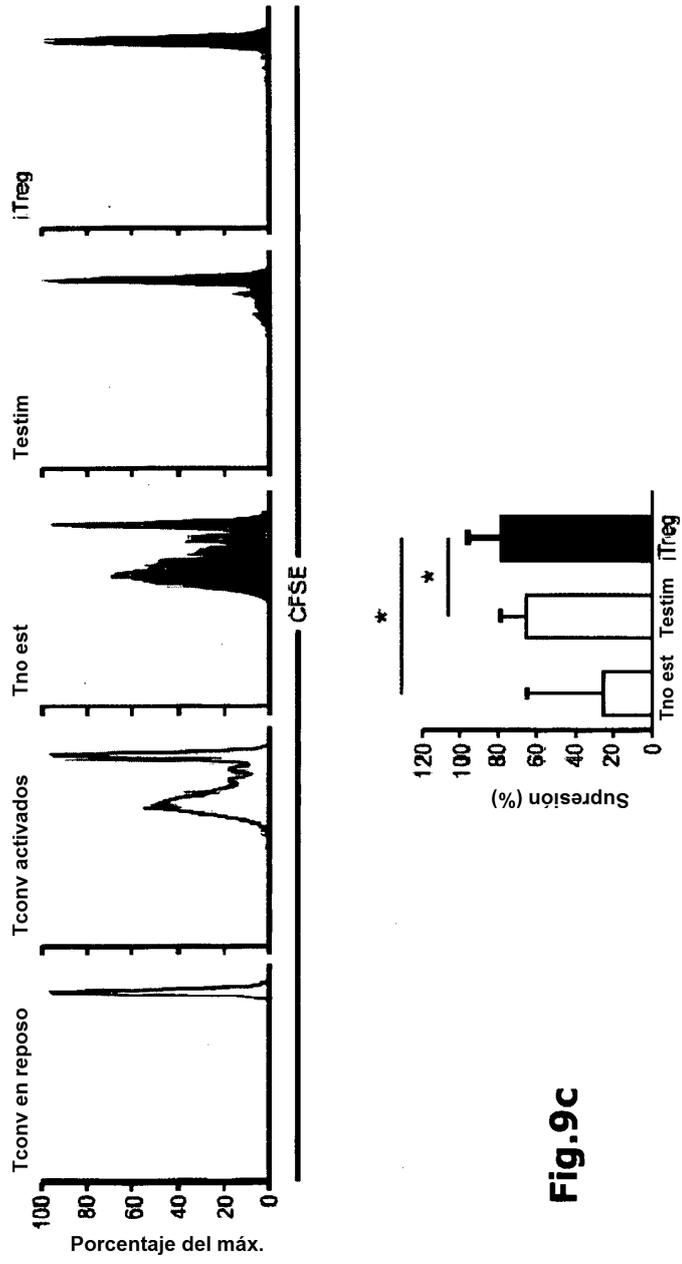
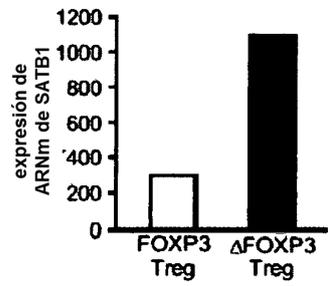
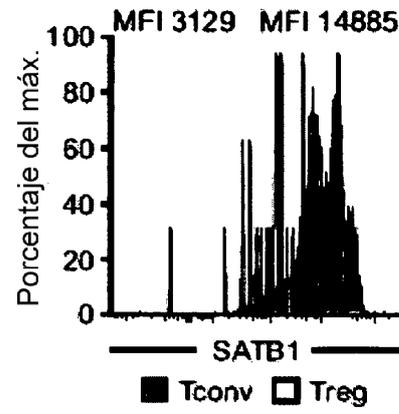
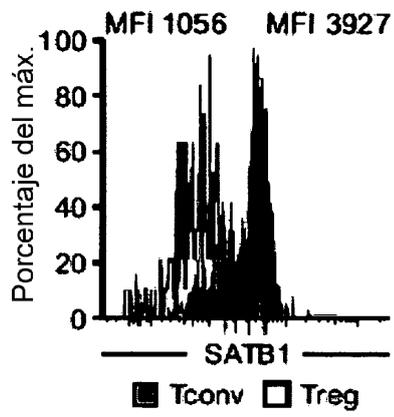


Fig.9c



```

homo_sapiens      AT--AAATGGTGAG---TTATGTTGCATACTGTATACTACTCATAGCAAATAGAGAAG
pan_troglodytes  AT--AAATAGTGAG---TTATGTTTGCATACTGTATACTACTCGTAGCAAATAGAGAAG
mus_musculus      ACAAAGCAGTGGG---TTCTGTTTGCGTA-----GCAGTTAAAGCAAATCAGACCAG
rattus_norvegicus ACAAGTGCAGAGGG---TTCTGTTTGCCTTCTGTGTAGCAGTTAGAGCAAATCAGACCAG
Canis_familiares ACGCCTATAGTGAG---TTCTGTTTGCACCCCTGAATACCACTCACAGCAGATCAGATAAG
bos_taurus        CCGAGCTGAGTGAA---TTACATTTGCACACCAGGTACCACTCACAGCAGATCAGACCAG
gallus_gallus     ACATCTGCAGTGTGATTTAGGTTCTCGTGCCTGCTACTCACAACAAATCAGGCAGG
consensus         TTATGTTTGCAT
    
```

motivo de unión de FOXP3 TACAAACG

Fig.12

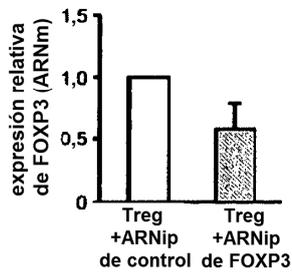


Fig.13a

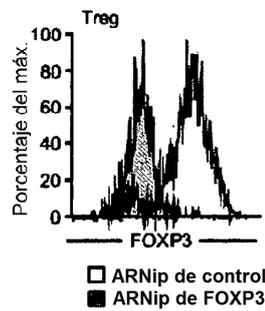


Fig.13b

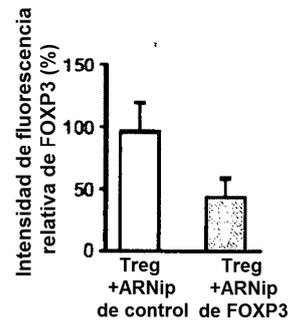


Fig.13c

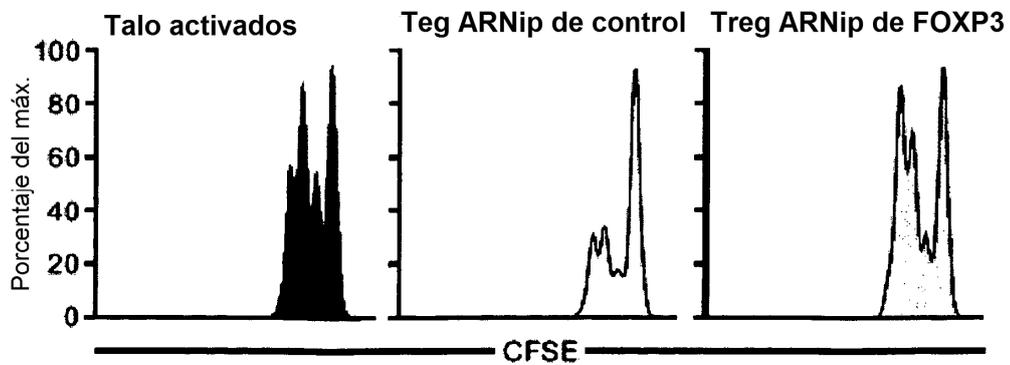


Fig.13d

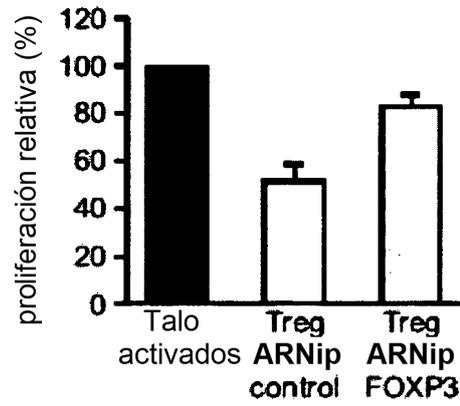


Fig.13e

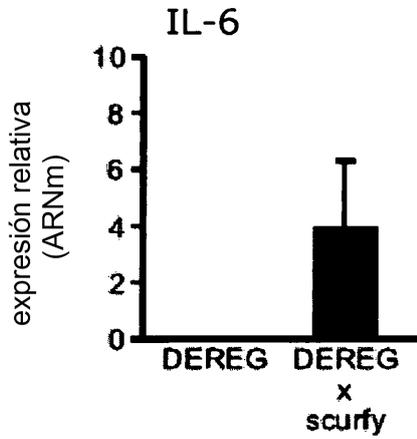


Fig.14a

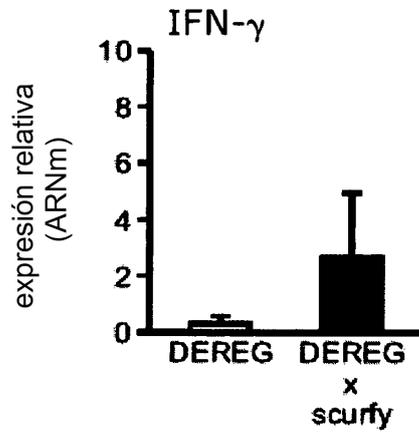


Fig.14b

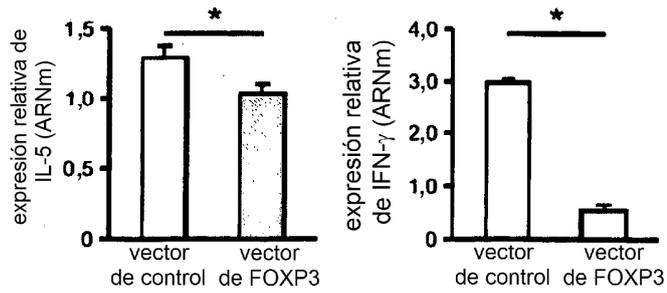


Fig.15

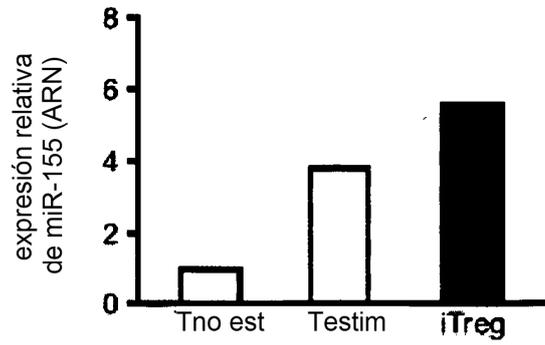


Fig.16

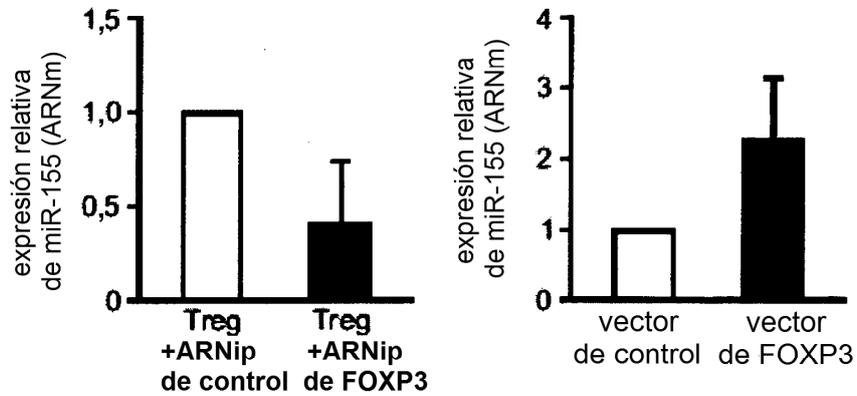


Fig.17

Fig.17b

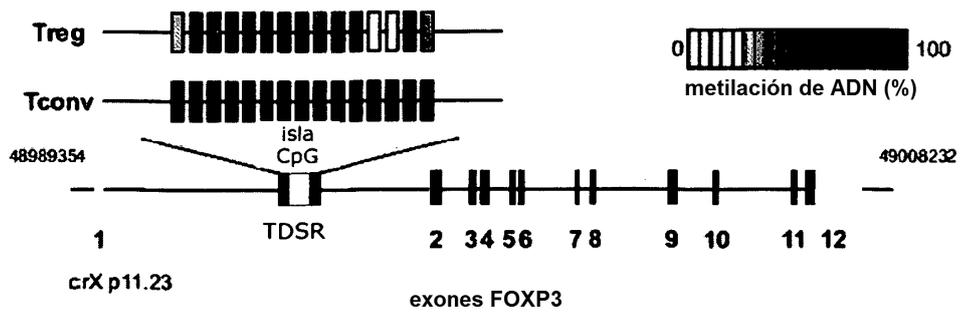


Fig.18

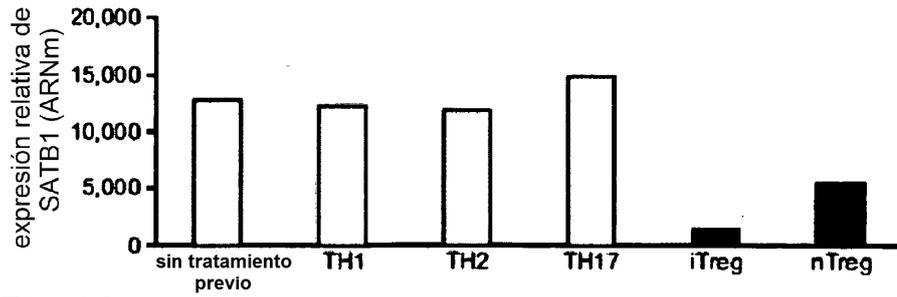


Fig.19a

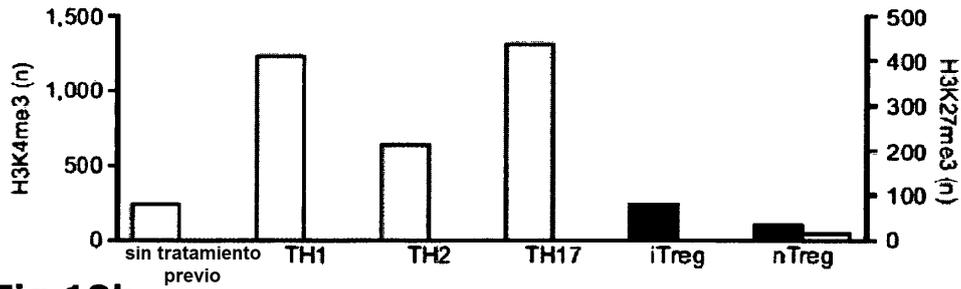


Fig.19b

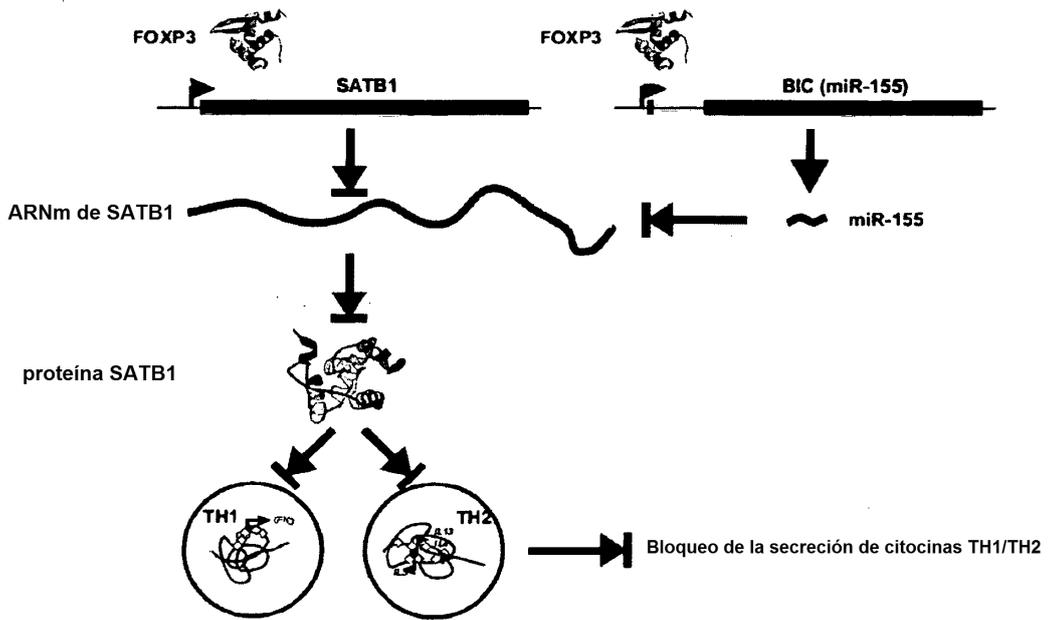


Fig.20a

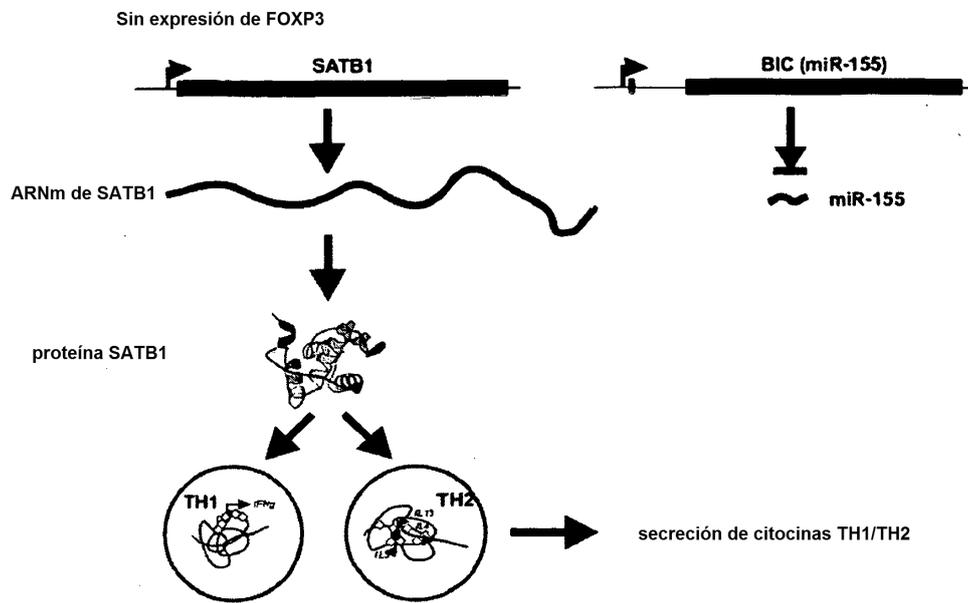


Fig.20b

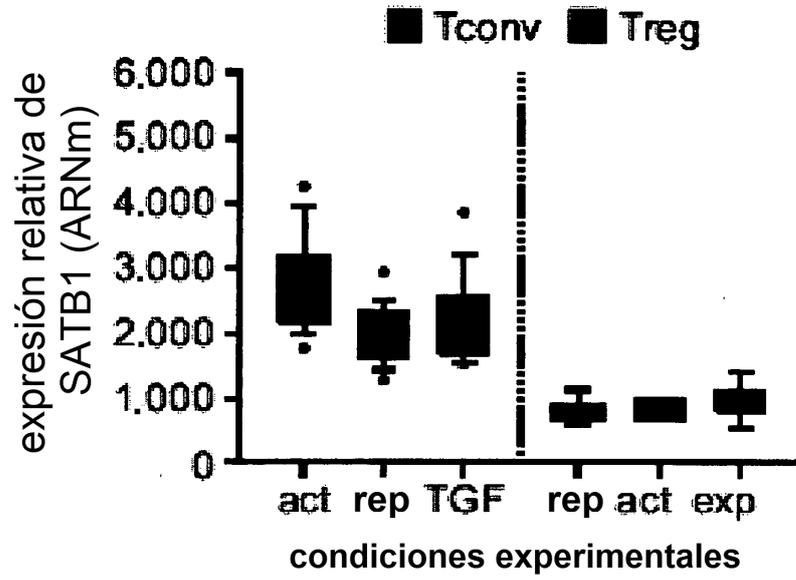


Fig.21a

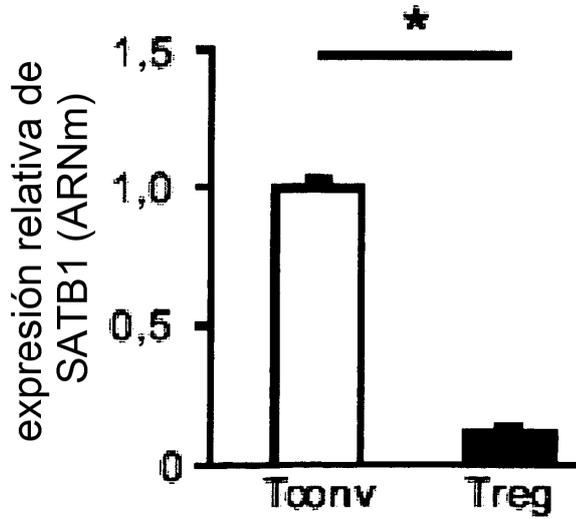


Fig.21b

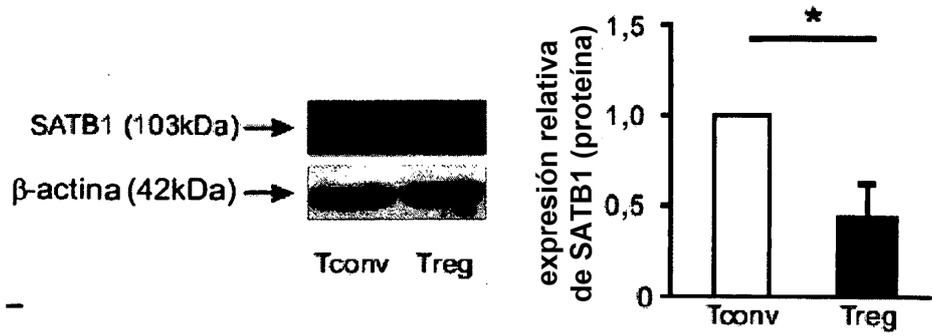


Fig.21c

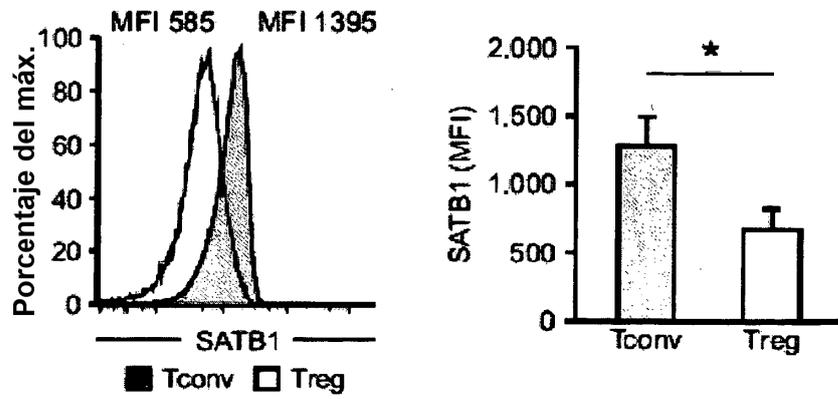


Fig.21d

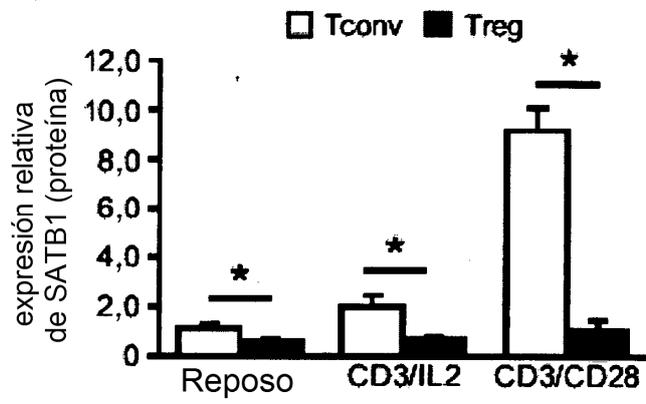


Fig.21e

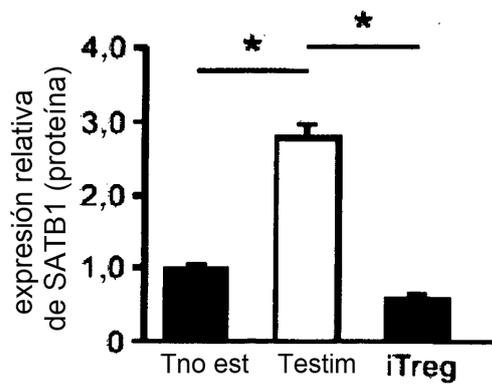


Fig.21f

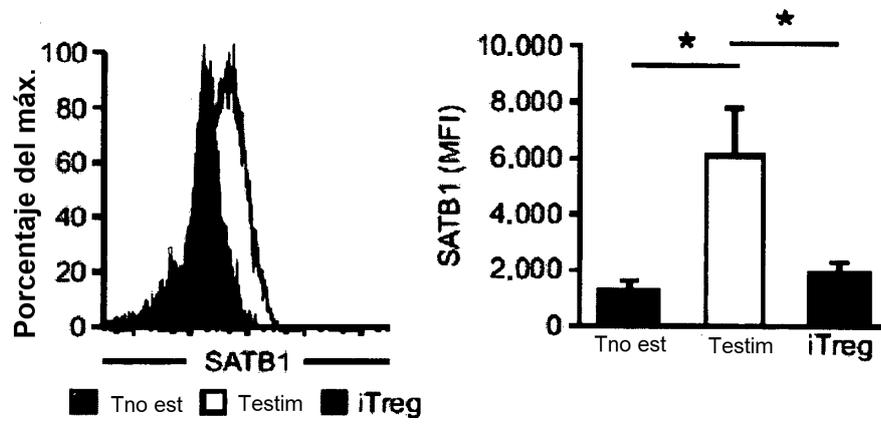


Fig.21g

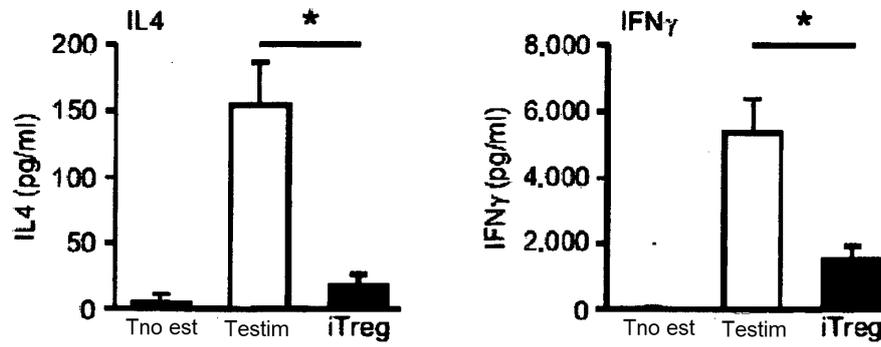


Fig.21h

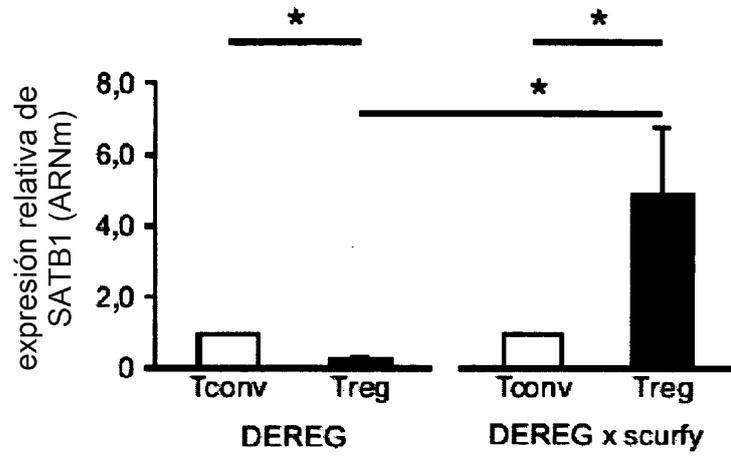


Fig.21i

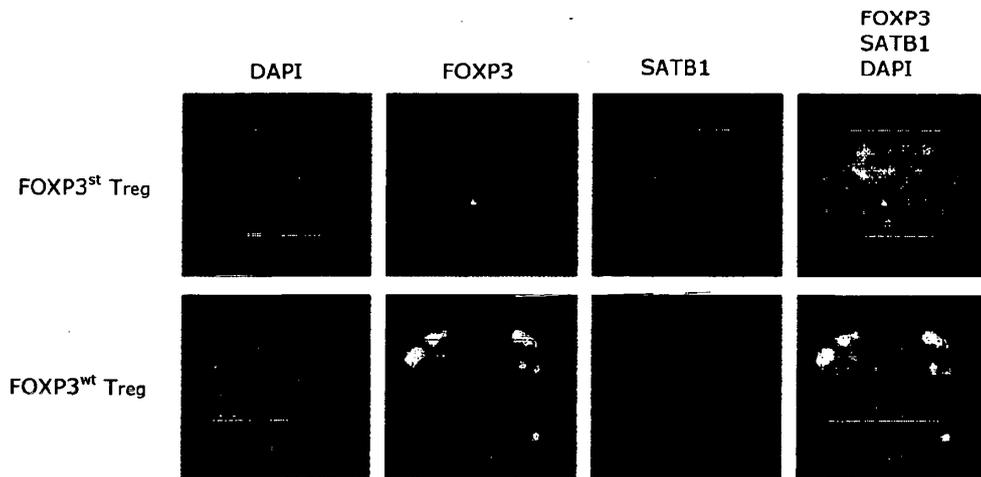


Fig.21j

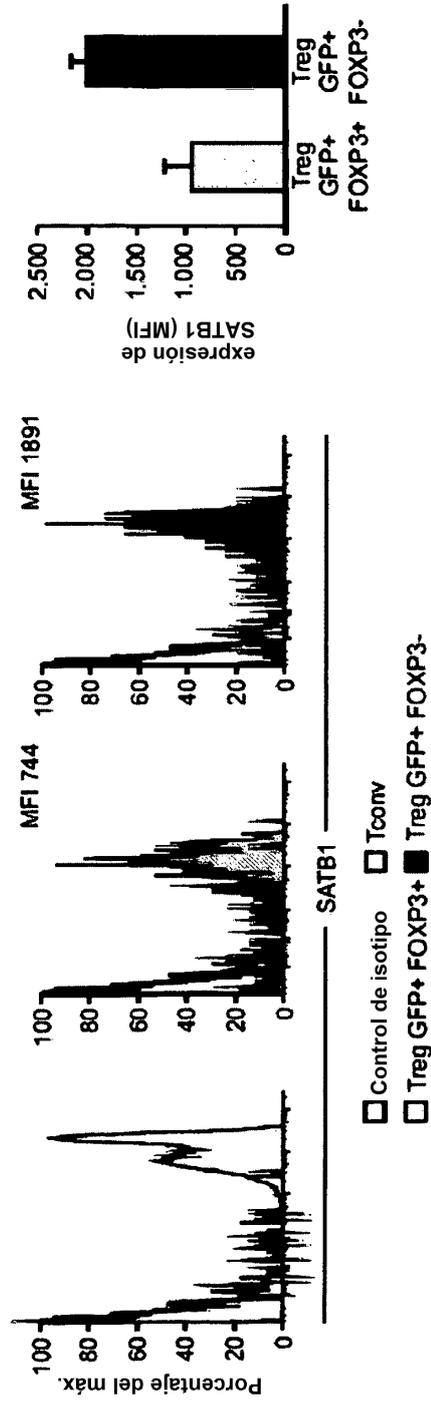


Fig.21k

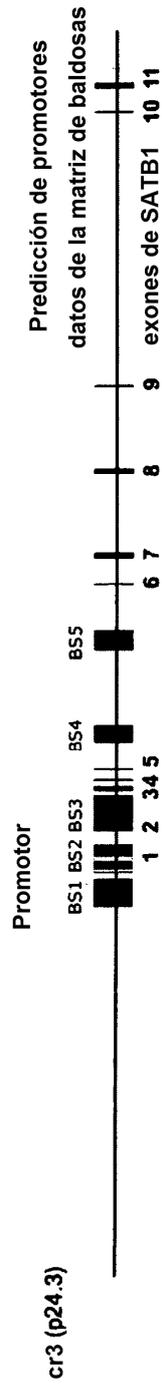


Fig.22a

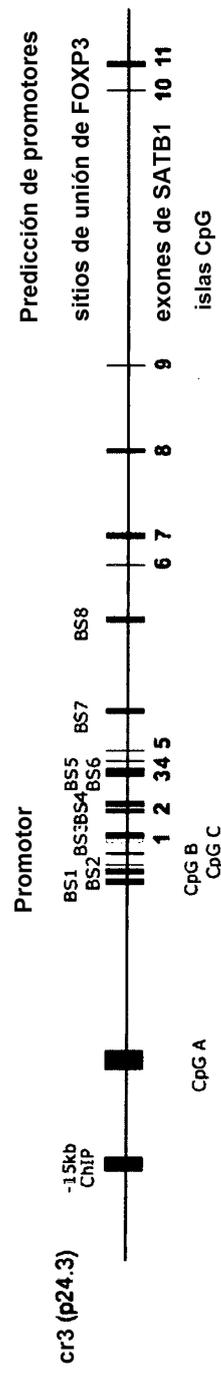


Fig.22b

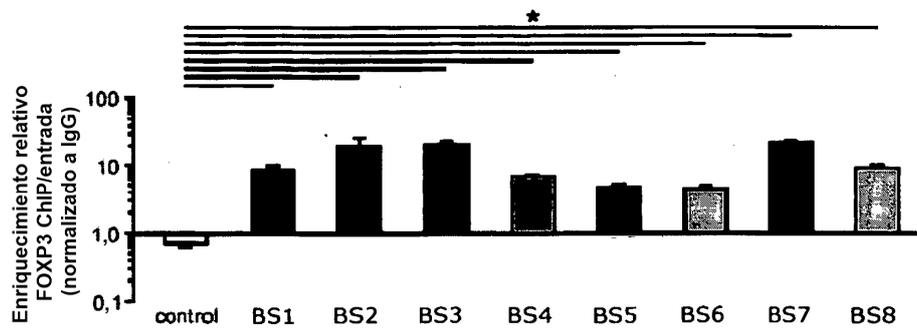


Fig.22c

K_D [$\mu\text{g/ml}$]	WT	mutados
BS1	1,52	2,36
BS2	0,28	1,17
BS3	0,89	1,35
BS4	0,32	0,46
BS5	1,56	1,45
BS6	0,53	1,01

Fig.22d

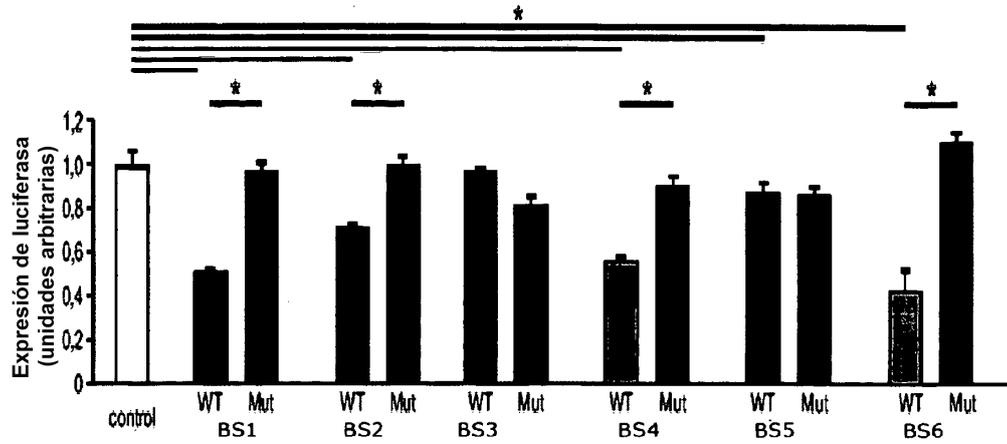


Fig.22e

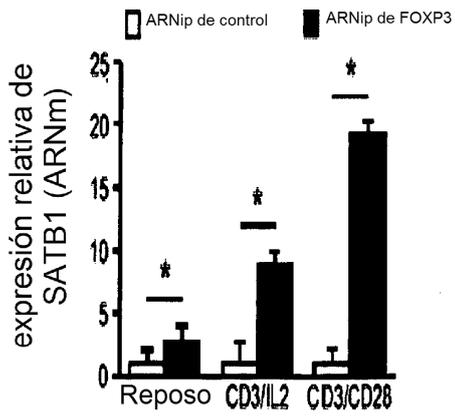


Fig.22f

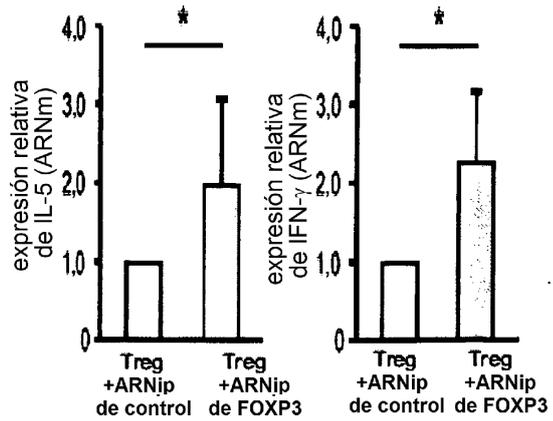


Fig.22g

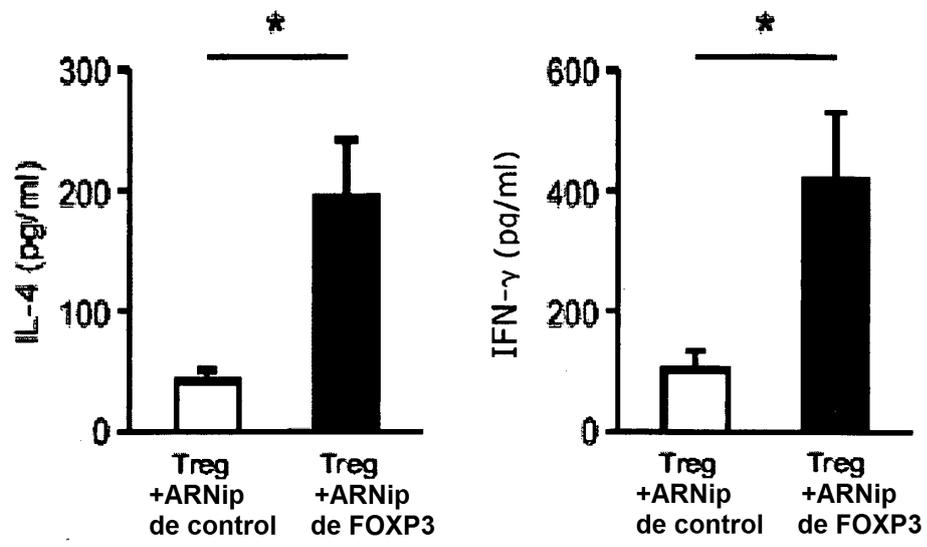


Fig.22h

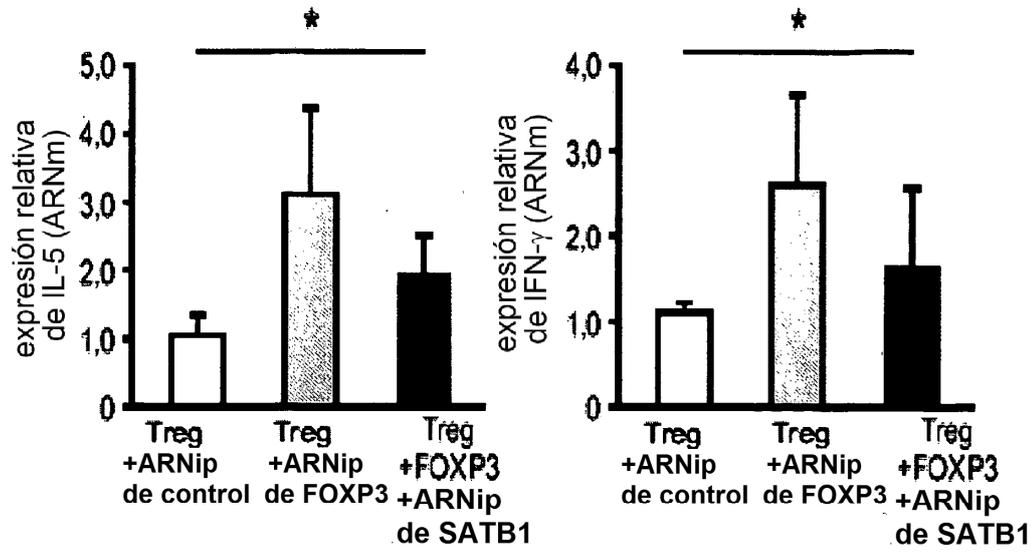


Fig.22i

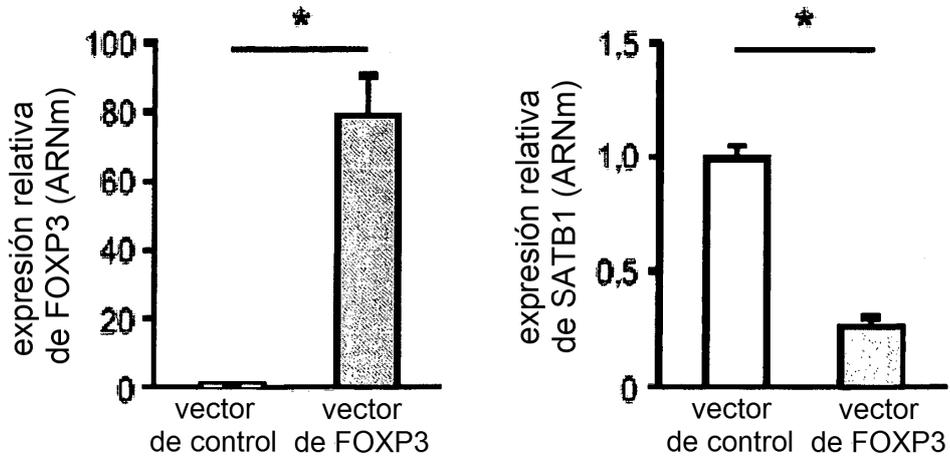


Fig.22j

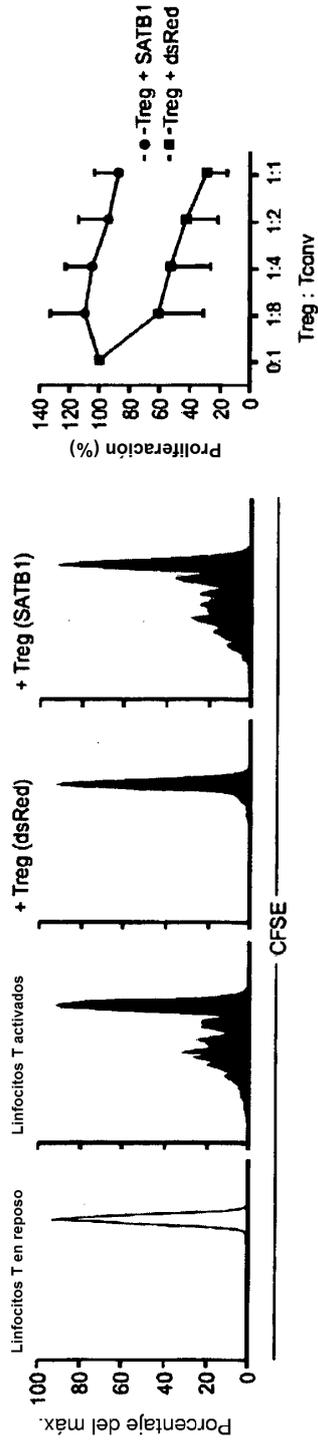


Fig.23a

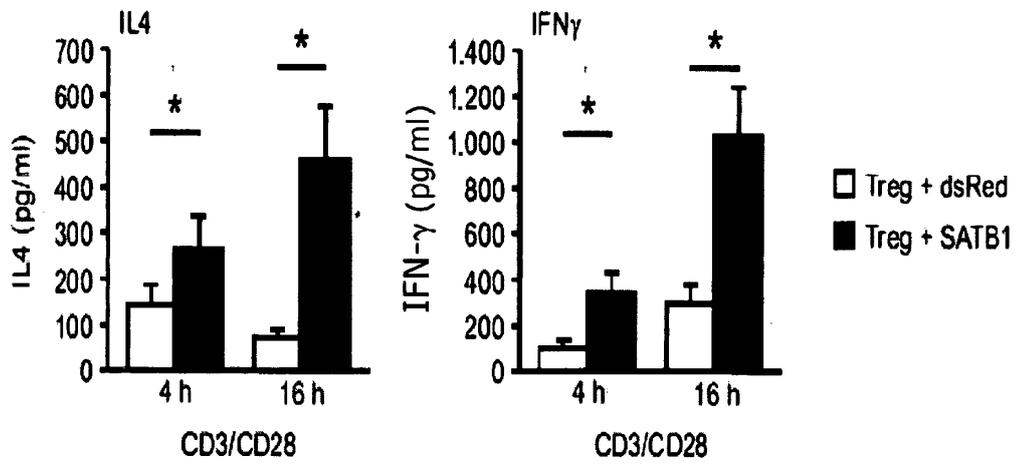
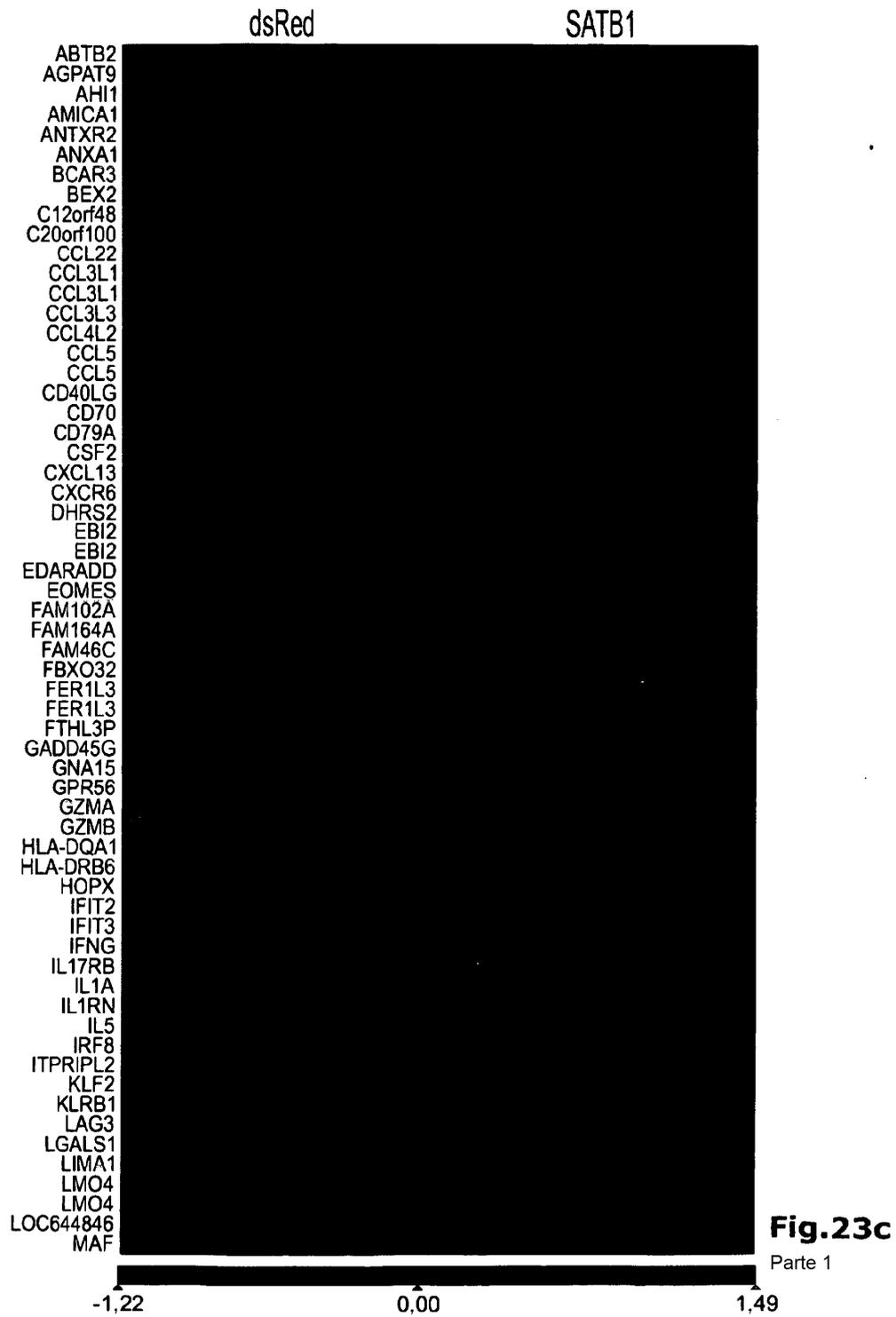


Fig.23b



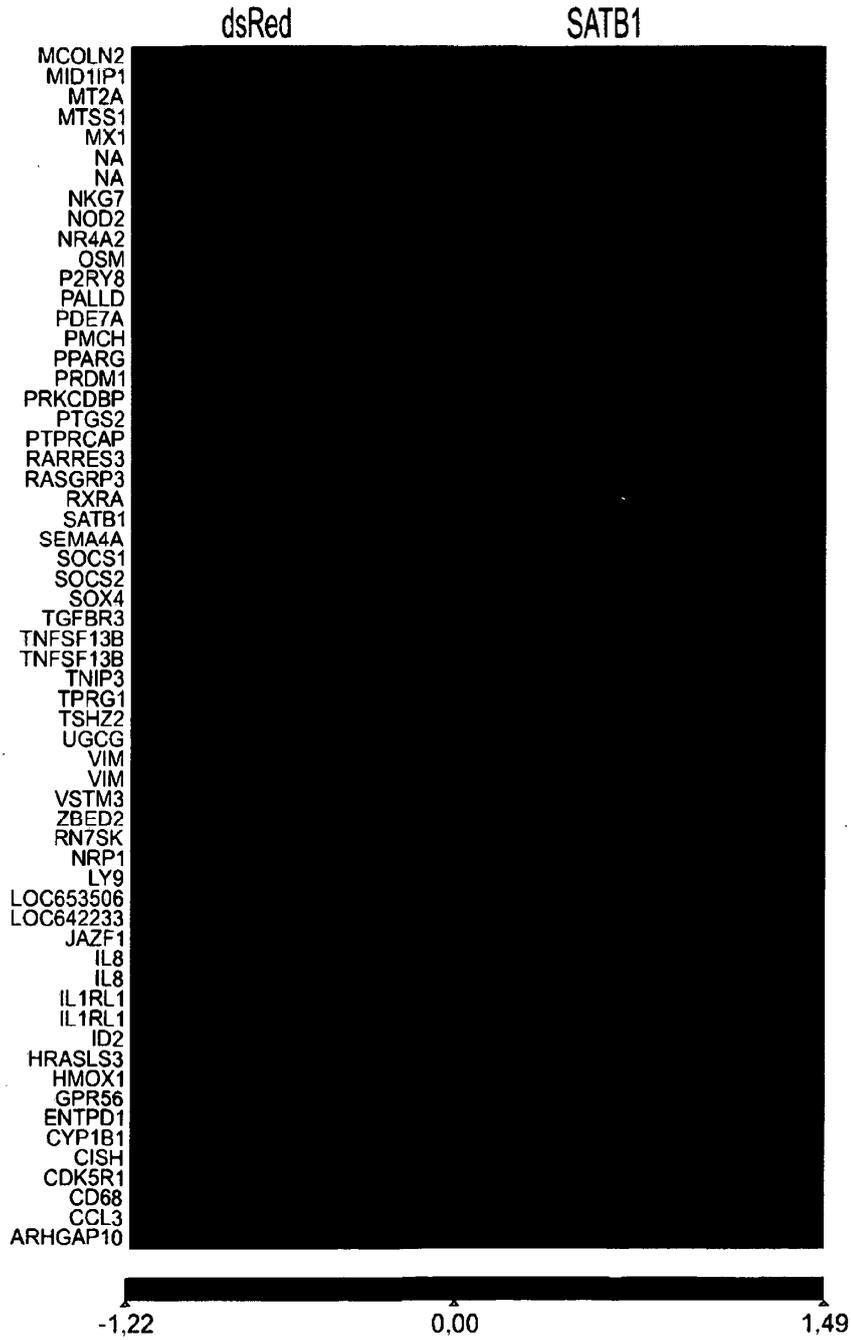


Fig.23c
Parte 2

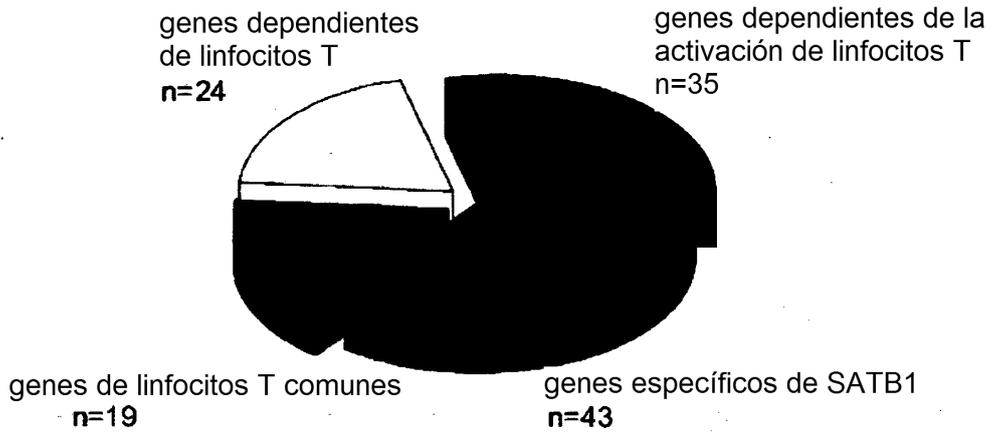


Fig.23d

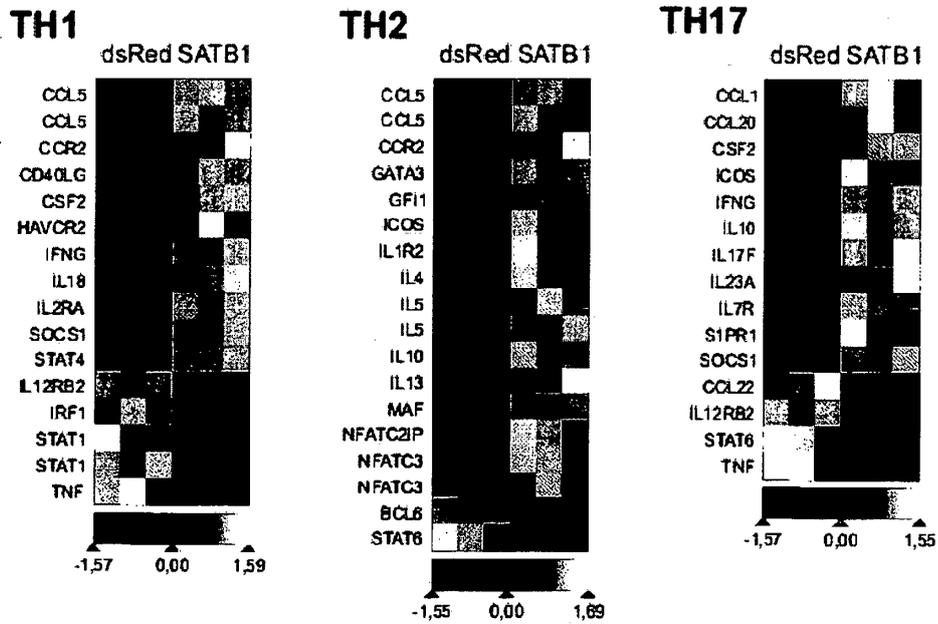


Fig.23e

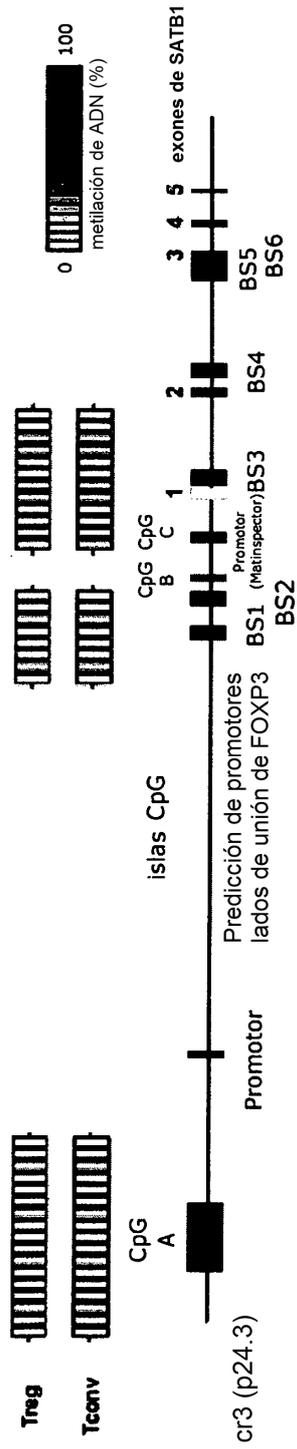


Fig.24a

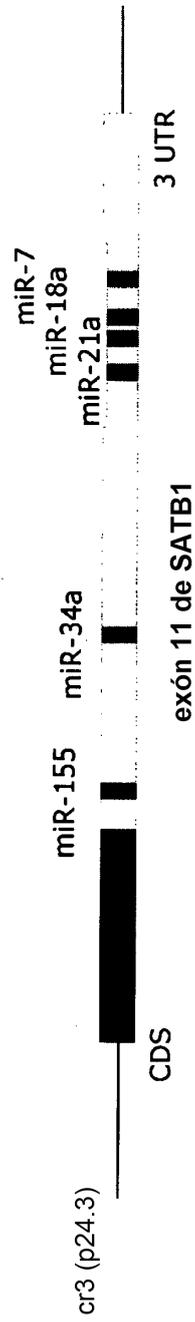


Fig.24b

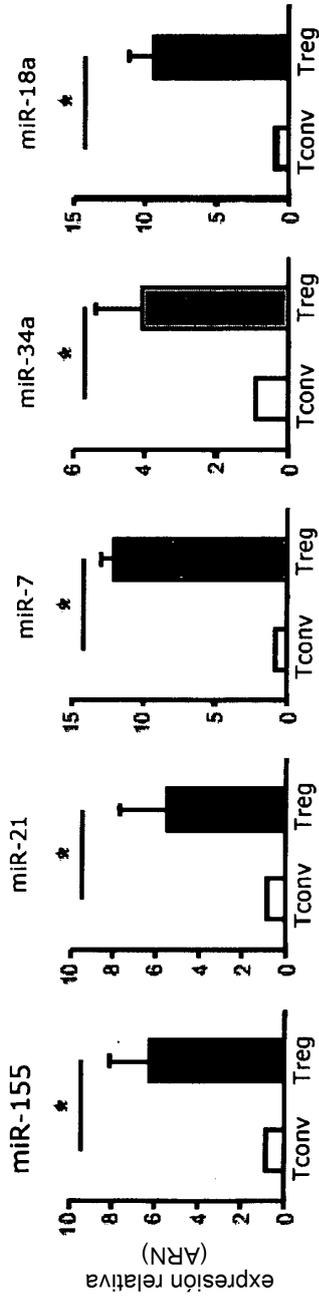


Fig.24c

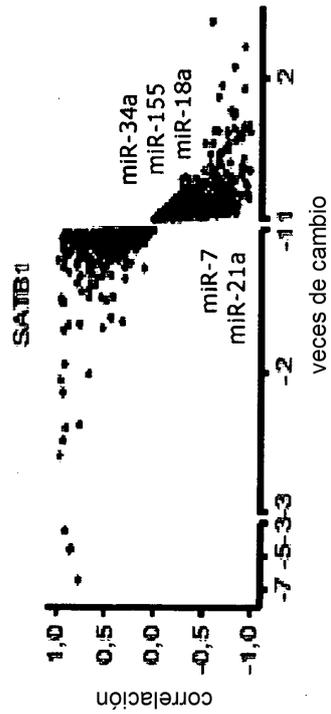


Fig.24d



Fig.24e

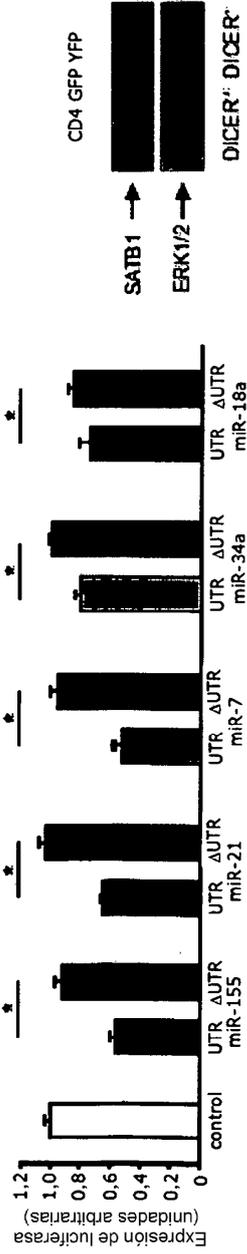


Fig.24f

Fig.24g

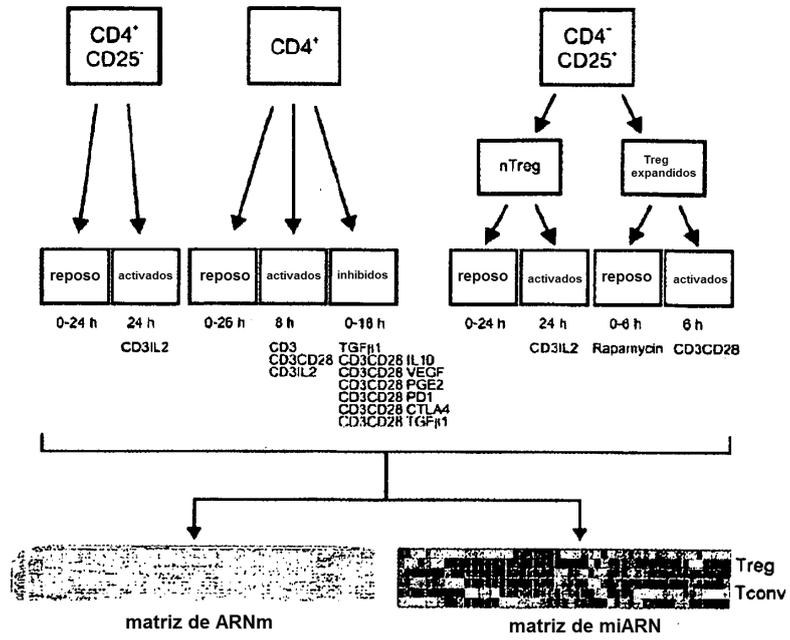


Fig.25

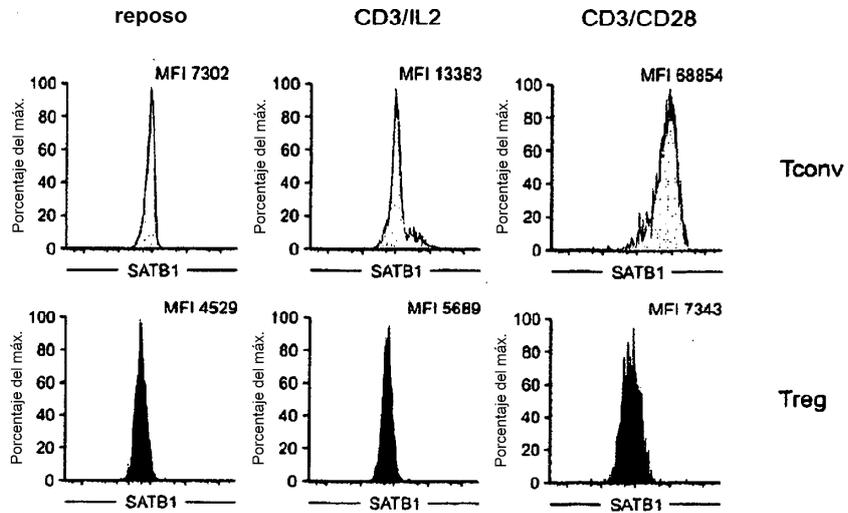


Fig.26

Fig.27a

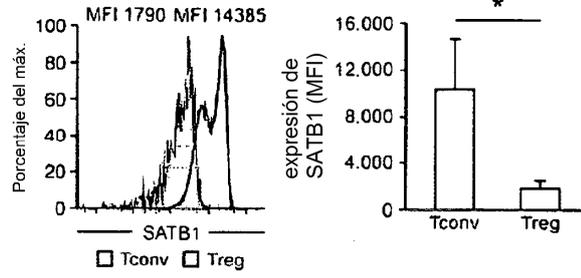


Fig.27b

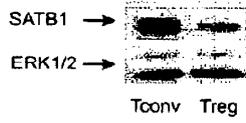


Fig.27c

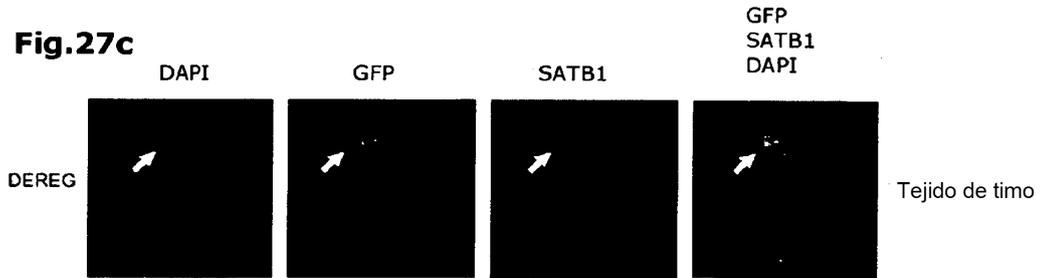


Fig.27d

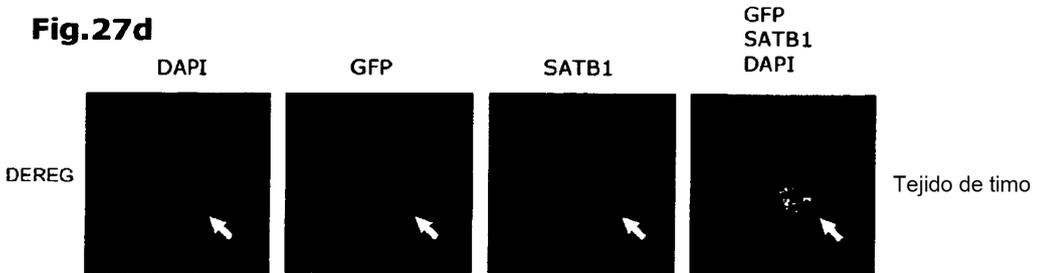


Fig.28a

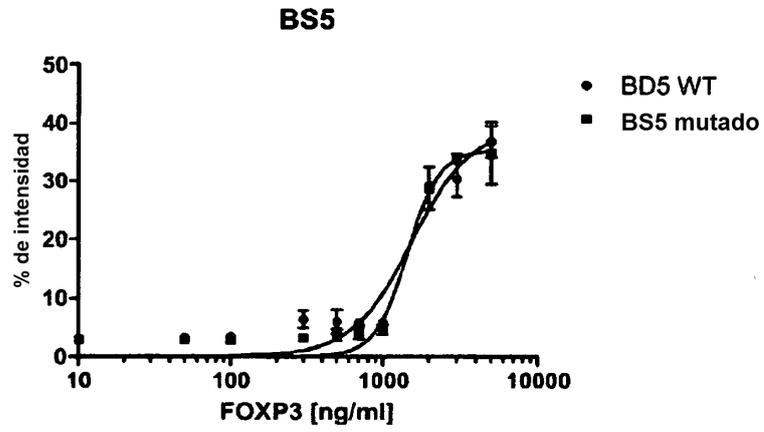


Fig.28b

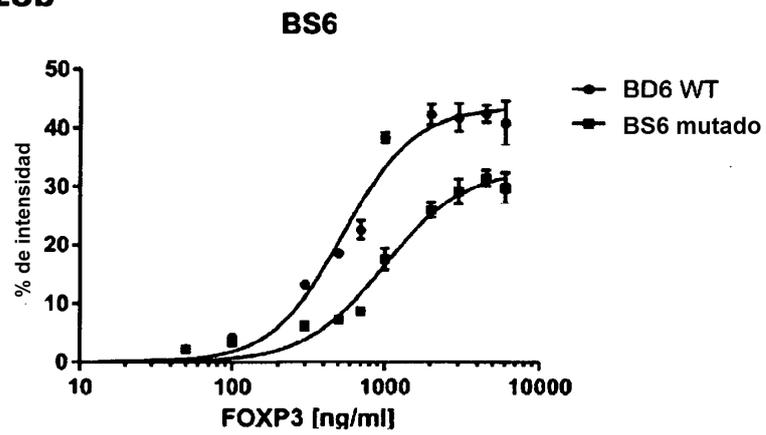


Fig.29a

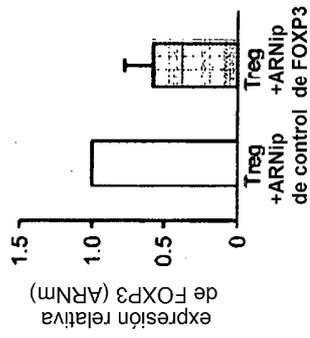


Fig.29b

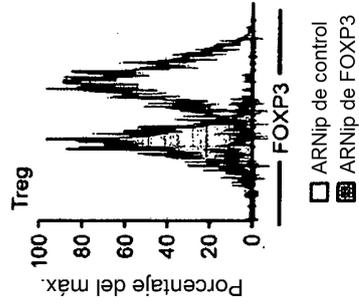


Fig.29c

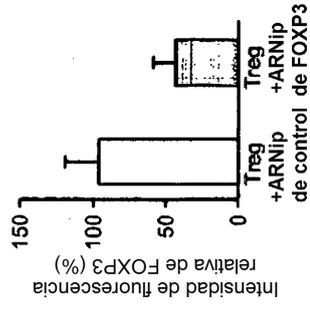


Fig.29d

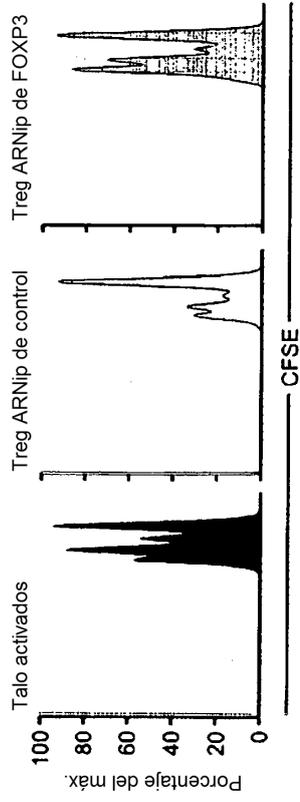


Fig.29e

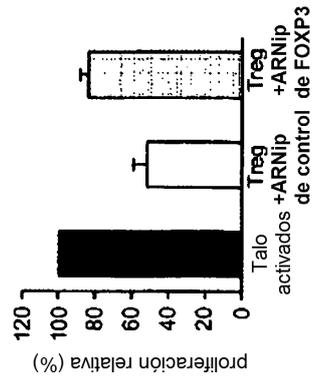


Fig.30a

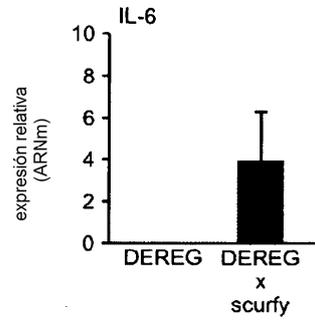


Fig.30b

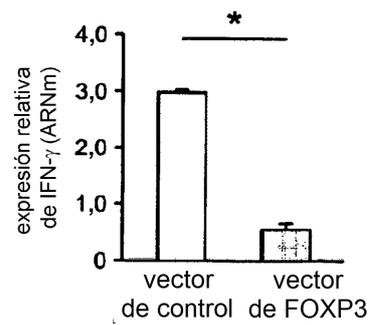
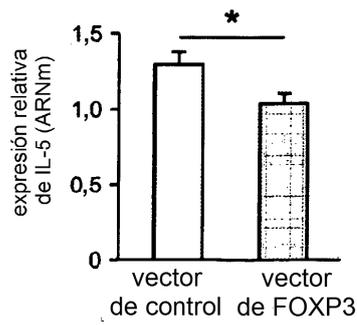
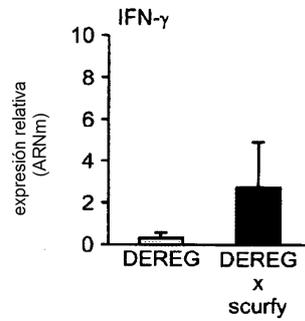


Fig.31

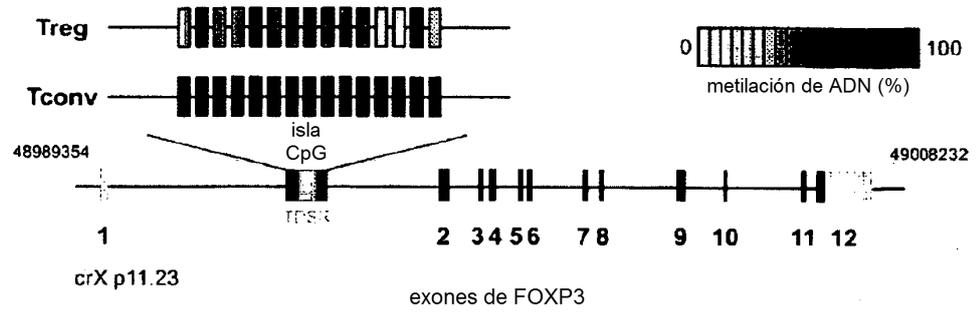


Fig.32

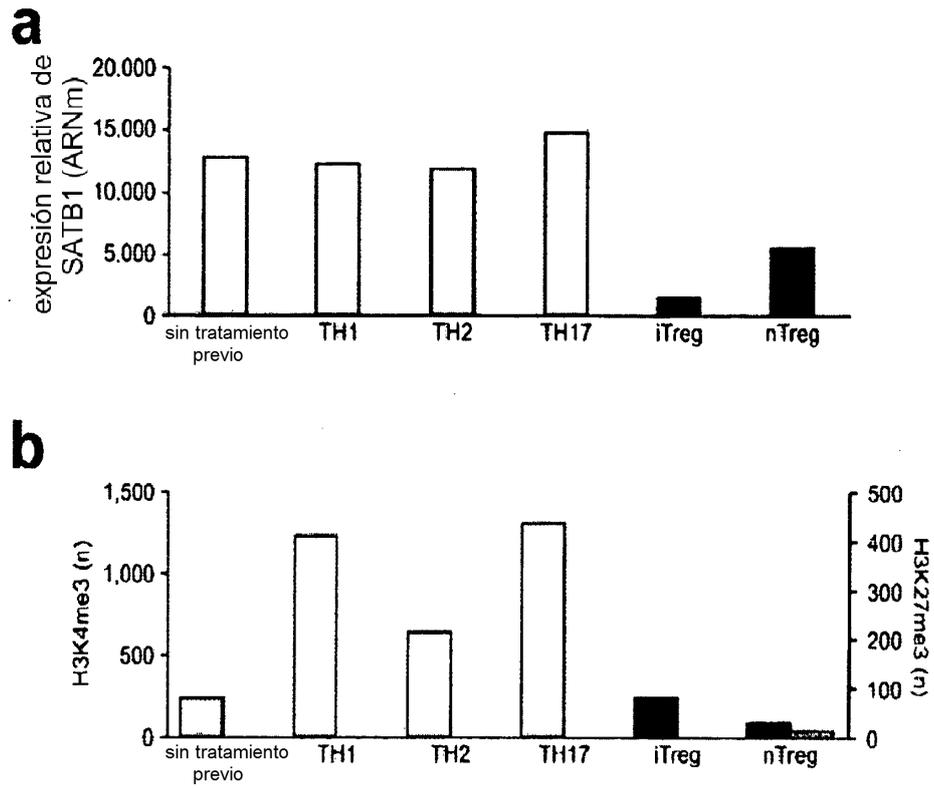


Fig.33

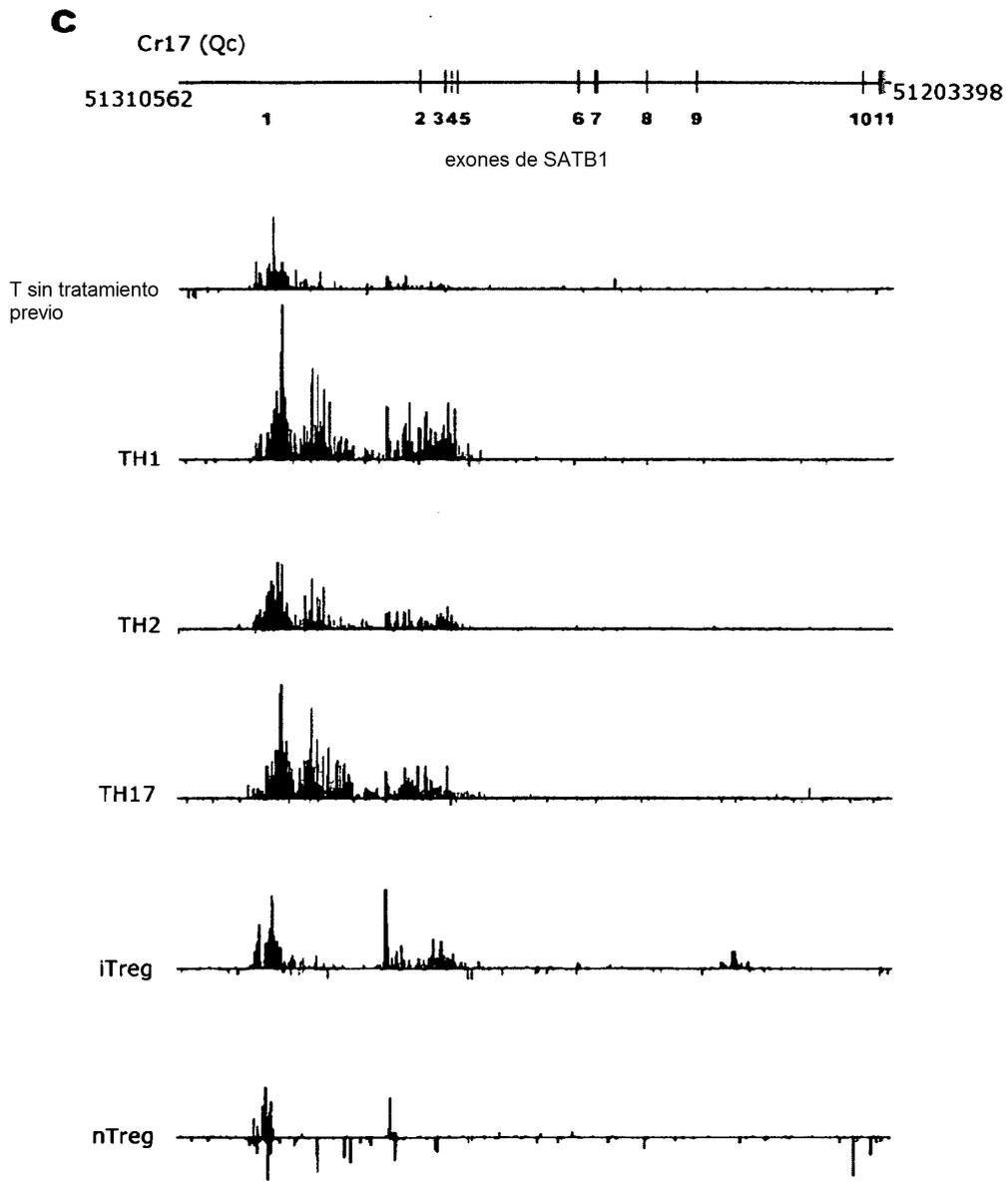
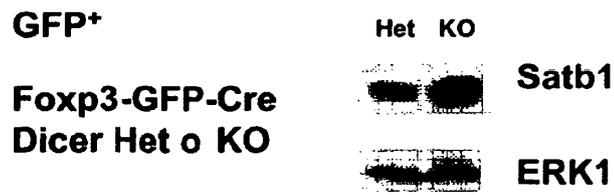
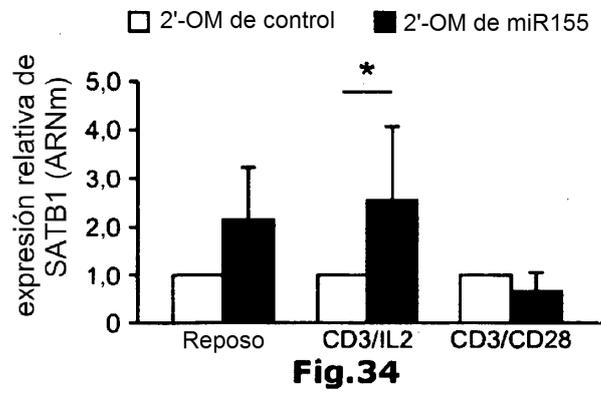


Fig.33



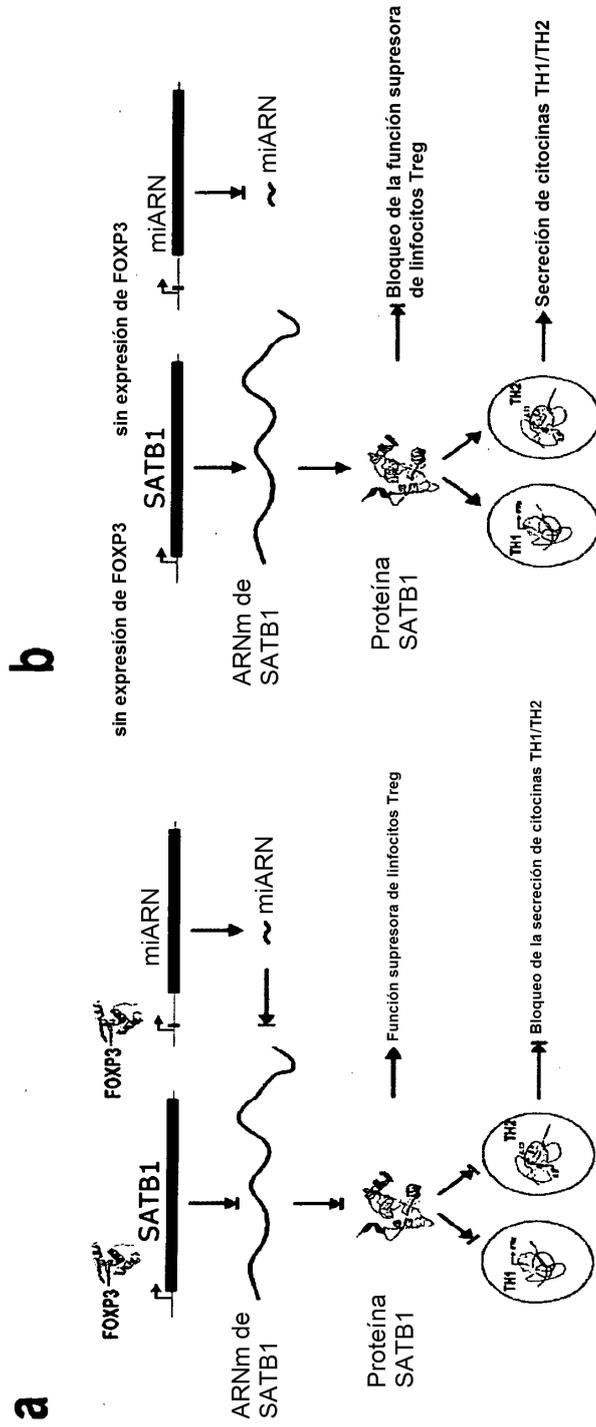


Fig.36