



JOANNA BUDNA

**LIMFOCYTY T REGULATOROWE
W MIKROŚRODOWISKU NOWOTWOROWEGO
WYSIĘKU OPLUCNOWEGO**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**PRACA WYKONANA W ZAKŁADZIE IMMUNOLOGII
KATEDRY IMMUNOLOGII KLINICZNEJ
UNIwersytetu Medycznego Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
PROMOTOR: DR HAB. N. MED. JAN SIKORA, PROF. UM**

**Praca dofinansowana z grantu promotorskiego MNiSW nr NN 402 428839
oraz z projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach
uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”,
Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego
przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego**

Poznań 2012

Serdeczne podziękowania składam
Panu dr hab. n. med. Janowi Sikorze, prof. UM
za cenne uwagi oraz wyrozumiałość
w trakcie przygotowania pracy doktorskiej
oraz
prof. zw. dr hab. med. Janowi Żeromskiemu
i
dr hab. n. med. Grzegorzowi Dworackiemu, prof. UM
za umożliwienie realizacji pracy naukowej

SPIS TREŚCI	
SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
WSTĘP	10
1. Patofizjologia opłucnej	10
2. Charakterystyka ogólna limfocytów T regulatorowych	13
2.1. Immunofenotyp limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+	14
2.2. Funkcje limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+	14
2.3. Inne typy limfocytów T regulatorowych	15
2.3.1. Komórki Tr1	15
2.3.2. Komórki Th3	16
2.3.3. Komórki CD8+	16
2.3.4. Komórki CD4-CD8- (DN)	16
2.3.5. Komórki T $\gamma\delta$	16
3. Rozwój i aktywność limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+	18
3.1. Wpływ FoxP3 na rozwój i aktywację limfocytów T regulatorowych	18
3.2. Rola TGF- β w indukcji ekspresji FoxP3 i funkcji limfocytów T regulatorowych	20
3.3. Wpływ IL-7 na dojrzewanie limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+	21
3.4. Interakcje limfocytów T regulatorowych z komórkami prezentującymi antygen	22
4. Mechanizmy blokowania odpowiedzi przeciwnowotworowej z udziałem komórek T regulatorowych	22
4.1. Mechanizm z udziałem cytokin blokujących	23
4.2. Mechanizm z udziałem cytotoksyczności	24
4.3. Mechanizm z udziałem cząsteczek powierzchniowych	25
4.3.1. Udział CD25 w bezpośrednim mechanizmie inhibicji	26
4.3.2. Pośredni mechanizm z udziałem blokowania komórek prezentujących antygen	27
4.3.2.1. Ekspresja enzymuIDO i rozkład tryptofanu	27
4.3.2.2. Immunosupresja w efekcie zjawiska trans-endocytozy	29
4.4. Inne mechanizmy	30
5. Kontrola odpowiedzi immunologicznej z udziałem cząsteczek powierzchniowych CD28, CTLA-4 oraz GITR	30
6. Limfocyty T regulatorowe w mikrośrodowisku nowotworu	32
6.1. Powstawanie antygenowo-specyficzných limfocytów T regulatorowych w mikrośrodowisku nowotworu	33
6.2. Aktywacja limfocytów T regulatorowych indukowana przez nowotwór	33
7. Apoptoza limfocytów T regulatorowych – kontrola odpowiedzi immunologicznej	35
8. Limfocyty T regulatorowe celem immunoterapii nowotworów	36
CELE PRACY	38
MATERIAŁY I METODY	40
1. Wysięki opłucnowe	40
1.1. Przygotowanie osadu komórek z wysięków opłucnowych	41
1.2. Badania cytologiczne	41
2. Badania cytometryczne	42
2.1. Ocena odsetka komórek T regulatorowych w wysiękach opłucnowych	42
2.2. Analiza danych	45

3.	Pomiar stężenia TGF- β 1 w wysiękach opłucnowych.....	46
3.1.	Oznaczenie stężenia TGF- β 1	46
4.	Izolacja komórek CD4+CD25+ z wysięków opłucnowych	48
4.1.	Selekcja negatywna – uzyskanie frakcji komórek CD4+	48
4.1.1.	Magnetyczne znakowanie komórek CD4-	48
4.1.2.	Separacja magnetyczna – eliminacja komórek CD4-	49
4.2.	Selekcja pozytywna – uzyskanie frakcji komórek CD4+CD25+	49
4.2.1.	Magnetyczne znakowanie komórek CD4+CD25+	49
4.2.2.	Separacja magnetyczna – uzyskanie frakcji komórek CD4+CD25+	49
5.	Pomiar względnego poziomu transkryptu wybranych genów limfocytów CD4+CD25+ z wysięków opłucnowych	51
5.1.	Izolacja całkowitego RNA	51
5.1.1.	Separacja fazowa	51
5.1.2.	Uzyskanie oczyszczonego RNA na kolumnach	52
5.2.	Pomiar stężenia uzyskanego całkowitego RNA	53
5.3.	Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)	53
5.4.	Amplifikacja cDNA z użyciem metody qRT-PCR	55
6.	Analiza statystyczna wyników	58
	WYNIKI	60
1.	Odsetek limfocytów T regulatorowych w wysiękach opłucnowych	60
2.	Stężenie TGF- β 1 w wysiękach opłucnowych	61
3.	Zależność odsetka komórek T regulatorowych od stężenia TGF- β 1 w mikrośrodowisku wysięku opłucnowego	62
4.	Względny poziom transkryptu genów <i>FOXP3</i> , <i>CD28</i> , <i>CTLA-4</i> oraz <i>GITR</i> w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków opłucnowych	62
5.	Korelacje pomiędzy wzrostami względnych poziomów transkryptu genów <i>FOXP3</i> , <i>CD28</i> , <i>CTLA-4</i> oraz <i>GITR</i> w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków opłucnowych	65
	DYSKUSJA	77
	WNIOSKI	99
	SPIS TABEL I RYCIN	100
	PIŚMIENNICTWO	104
	STRESZCZENIE	130
	SUMMARY	132

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AICD	- apoptoza indukowana przez aktywację (ang. <i>activation-induced cell death</i>)
Akt	kinaza serynowo/treoninowa Akt (ang. <i>serine/threonine-specific protein kinase Akt</i>)
APC	- komórka prezentująca antygen (ang. <i>antigen presenting cell</i>)
Bcl-2	- antygen chłoniaka z limfocytów B (ang. <i>B-cell lymphoma antigen 2</i>)
B-CLL	- przewlekła białaczka limfocytowa B-komórkowa (ang. <i>B-cell chronic lymphocytic leukemia</i>)
Bcl-xl	- antygen chłoniaka z limfocytów B (ang. <i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
BMDC	- komórki dendrytyczne pochodzenia szpikowego (ang. <i>bone marrow-derived dendritic cells</i>)
CCL	- ligand chemokin posiadających motyw C-C (ang. <i>chemokine (C-C motif) ligand</i>)
CCR	- receptor chemokin posiadających motyw C-C (ang. <i>chemokine (C-C motif) receptor</i>)
cDNA	- komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CLL	- przewlekła białaczka limfatyczna (ang. <i>chronic lymphocytic leukemia</i>)
COP-I	- kopolimer-I (ang. <i>copolymer-I</i>)
COX -2	- cyklooksygenaza indukowana (ang. <i>cyclooxygenase-2</i>)
CTLA-4	- antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T (ang. <i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4</i>)
CXCR	- receptor chemokin posiadających motyw C-X-C (ang. <i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>)
dATP	- trójfosforan deoksyrybozoadeninowy (ang. <i>deoxyadenosine triphosphate</i>)
DC	- komórka dendrytyczna (ang. <i>dendritic cell</i>)
dCTP	- trójfosforan deoksyrybozocytozynowy (ang. <i>deoxycytidine triphosphate</i>)

dGTP	- trójfosforan deoksyrybozoguaninowy (ang. <i>deoxyguanosine triphosphate</i>)
DN Tregs	- CD4-CD8- komórka regulatorowa (ang. <i>double-negative regulatory T-cell</i>)
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNMT1	- DNA metylotransferaza 1 (ang. <i>DNA methyltransferase 1</i>)
dNTP	- trójfosforany deoksyrybonukleotydów (ang. <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>)
dTTP	- trójfosforan deoksyrybozotymidinowy (ang. <i>deoxythymidine triphosphate</i>)
EAE	- myszy model stwardnienia rozsianego (ang. <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>)
ELISA	- test immunoenzymatyczny (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
Fas	- apoptotyczny receptor Fas (ang. <i>fas receptor</i>)
FasL	- ligand apoptotycznego receptora Fas (ang. <i>fas receptor ligand</i>)
FoxP3	- czynnik transkrypcyjny (ang. <i>forkhead box P3</i>)
FSC	- rozproszenie przednie (ang. <i>forward scatter channel</i>)
GAPDH	- dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GIST	- nowotwór podścieliska przewodu pokarmowego (ang. <i>gastrointestinal stromal tumor</i>)
GITR	- receptor indukowanego glukokortykoidami czynnika martwicy nowotworu (ang. <i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor - related protein</i>)
GITR-L	- ligand receptora indukowanego glukokortykoidami czynnika martwicy nowotworu (ang. <i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor - related protein ligand</i>)
GM-CSF	- czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GvHD	- Choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (ang. <i>graft-versus-host disease</i>)
GzmB	- granzym B (ang. <i>granzyme B</i>)

HA	- kwas 3-hydroksyantranilowy (ang. <i>3-hydroksyanthranilic acid</i>)
HEPES	- kwas hydroksyetylodietylenodiaminoetanolosulfonowy (ang. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HER-2	- receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (ang. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HIV	- ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA-DR	- ludzkie antygeny leukocytarne (ang. <i>human leukocyte antigen-DR</i>)
HO-1	- oksygenaza hemowa 1 (ang. <i>heme oxygenase 1</i>)
HTLV-1	- wirus ludzkiej białaczki z komórek T 1 (ang. <i>human T-cell leukemia/lymphoma virus 1</i>)
IASLC	- Międzynarodowe Towarzystwo Badań nad Rakiem Płuca (ang. <i>international association for the study of lung cancer</i>)
IBD	- choroba zapalna jelit (ang. <i>inflammatory bowel disease</i>)
ICAM	- cząsteczka adhezji międzykomórkowej (ang. <i>intracellular adhesion molecule</i>)
IDO	- 2,3-dioksygenaza indolo-aminy (ang. <i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>)
IFN- γ	- interferon gamma (ang. <i>interferon gamma</i>)
IL	- Interleukina (ang. <i>interleukin</i>)
IL-R	- receptor dla interleukiny (ang. <i>interleukin receptor</i>)
IPEX	- ang. <i>immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy, X-linked syndrome</i>
iTregs	- indukowane komórki T regulatorowe (ang. <i>induced T regulatory T-cells</i>)
LAG-3	- gen aktywujący limfocyty (ang. <i>lymphocyte-activation gene 3</i>)
LAP	- mały kompleks latentny (ang. <i>latency-associated peptide</i>)
LFA-1; 3	- antygen funkcji limfocytów 1; 3 (ang. <i>lymphocyte function-associated antigen 1; 3</i>)
LTBP	- białko wiążące latentną formę TGF- β (ang. <i>latent TGF-β-binding protein</i>)
MHC I; II	- główny kompleks zgodności tkankowej klasy I; II (ang. <i>major histocompatibility complex class I; II</i>)
MS	- stwardnienie rozsiane (ang. <i>multiple sclerosis</i>)

mTOR	kinaza mTOR, ssaczy cel rapamycyny (ang. <i>mammalian target of rapamycin</i>)
NDRP	- niedrobnokomórkowy rak płuca
NFAT	- jądrowy czynnik aktywowanych komórek T (ang. <i>nuclear factor of activated T cells</i>)
NF- κ B	- czynnik transkrypcyjny κ B (ang. <i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells</i>)
NK	- komórki naturalni zabójcy (ang. <i>natural killer</i>)
NKG2D	- aktywujący receptor komórek NK
NOD	- Mysi model cukrzycy typu I (ang. <i>non-obese diabetic mice</i>)
nTregs	- naturalne komórki T regulatorowe (ang. <i>natural T regulatory T-cells</i>)
PBS	- sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCD	- delecja poliklonalna (ang. <i>polyclonal deletion</i>)
PD-1; 2	- receptor programowanej śmierci 1; 2 (ang. <i>programmed death-1; 2</i>)
PD-L1; 2	- ligand receptora programowanej śmierci 1; 2 (ang. <i>programmed death-1; 2 ligand</i>)
PE	- fikoerytryna (ang. <i>phycoerythrin</i>)
PE-Cy5	- fikoerytryna-cyjanina 5 (ang. <i>phycoerythrin-cyanine 5</i>)
PGE ₂	- prostaglandyna E ₂ (ang. <i>prostaglandin E₂</i>)
PI3K	- kinaza 3 fosfatydyloinozytolu (ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
qRT-PCR	- łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (ang. <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>)
RAG	- gen aktywujący rekombinację segmentów VDJ (ang. <i>recombination activating gene</i>)
REL	- gen czynnika transkrypcyjnego c-Rel z rodziny NF- κ B (ang. <i>gene coding proto-oncogene c-Rel member of the NF-κB family</i>)
RNA	- kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RT	- Reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. <i>reverse transcription</i>)
SCID	- ciężki złożony niedobór odporności (ang. <i>severe combined immunodeficiency</i>)
SKP-3	- kinaza SKP-3 (ang. <i>sensor kinase protein 3</i>)
Smad3	- ang. <i>smad family member 3</i>

SSC	- rozproszenie boczne (ang. <i>side scatter channel</i>)
STAT	- przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji (ang. <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
TCR	- receptor limfocytów T (ang. <i>T-cell receptor</i>)
Tef	- limfocyty T efektorowe (ang. <i>T effector lymphocytes</i>)
TGF- β	- transformujący czynnik wzrostu β (ang. <i>transforming growth factor-β</i>)
Th	- limfocyty T pomocnicze (ang. <i>T helper cells</i>)
TILs	- limfocyty naciekające guza (ang. <i>tumor infiltrating lymphocytes</i>)
TLR	- receptory toll-podobne (ang. <i>toll-like receptors</i>)
TNF	- czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
TNF-R	- receptor czynnika martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor receptor</i>)
TNFRII	- receptor czynnika martwicy nowotworu, typ II (ang. <i>tumor necrosis factor receptor type II</i>)
TNF- α	- czynnik martwicy nowotworu α (ang. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TNM	- klasyfikacja stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu (ang. <i>tumor nodules metastases</i>)
Tr1	- limfocyty T regulatorowe typu 1 (ang. <i>T regulatory cells type 1</i>)
TRAIL /DR5	- kompleks indukujący apoptozę (ang. <i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/death receptor 5</i>)
TREC	- kolistą cząsteczką DNA (ang. <i>T-cell receptor rearrangements excision circles</i>)
Treg	- limfocyty T regulatorowe (ang. <i>T regulatory cells</i>)
TRIZol	- mieszanina fenolu i izotiocyanianu guanidyny (ang. <i>phenol-guanidinium isothiocyanate</i>)
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłonnka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

WSTĘP

1. Patofizjologia opłucnej

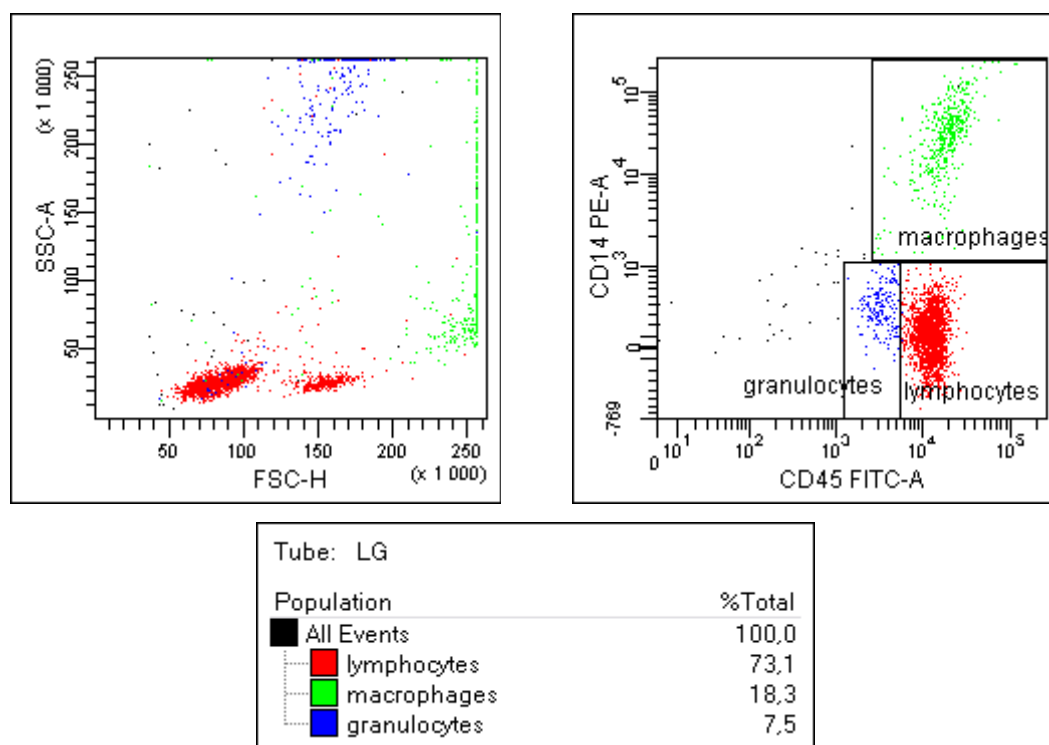
Opłucna stanowi błonę surowiczą pokrywającą powierzchnię płuc i wyściełającą od strony wewnętrznej jamę klatki piersiowej. Zbudowana jest z dwóch blaszek – ściennej i trzewnej. Blaszka ścienna (opłucna ścienna) pokrywa śródpiersie, powieź piersiową, górne powierzchnie przepony oraz wewnętrzną powierzchnię ściany klatki piersiowej. Natomiast blaszka trzewna (opłucna płucna) stanowi zewnętrzną warstwę płuca, ściśle do niego przylegając. Pomiędzy obiema blaszkami znajduje się przestrzeń opłucnowa. Odpowiada ona za prawidłową mechanikę oddychania a ciśnienie w niej panujące ma wpływ na objętość i stan czynnościowy płuc, serca oraz klatki piersiowej. Płyn śródopłucnowy wypełniający przestrzeń pomiędzy blaszkami opłucnej nawilża ich powierzchnię, zmniejszając siły tarcia pomiędzy płucami a klatką piersiową podczas ruchów oddechowych [1]. Ustalono, że u człowieka w warunkach prawidłowych całkowita objętość płynu nie przekracza 260μl/kg masy ciała [2]. Tworzy się on jako przesącz z naczyń mikrokrażenia opłucnej, szczególnie opłucnej ściennej, zaopatrywanej w krew przez krążenie systemowe. Przepływ płynu pomiędzy przestrzenią wewnątrznacyniową a jamą opłucnej zależy od różnicy ciśnień hydrostatycznych i onkotycznych w tych przestrzeniach [3].

Objętość płynu w jamie opłucnej jest zależna od zachowania równowagi pomiędzy wytwarzaniem płynu w jamie opłucnej a jego absorpcją. W przypadku zachwiania tych proporcji dochodzi do gromadzenia zwiększonej ilości płynu w jamie opłucnej [4]. W zależności od etiopatologii płyny opłucnowe dzieli się na przesiekowe (łac. *transsudatum*) oraz wysiękowe (łac. *exsudatum*). Głównym czynnikiem różnicującym wysięk od przesieku jest stężenie białka lub dehydrogenazy mleczanowej w jego składzie [5]. Płyn przesiekowy może z czasem stać się wysiękowym. Do patologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za nadmierną ilość płynu w jamie opłucnej można zaliczyć wytwarzanie jego zwiększonej ilości. Może być ono wynikiem wzrostu ciśnienia hydrostatycznego w naczyniach opłucnej spowodowanego niewydolnością komór serca, obniżenia ciśnienia opłucnowego wywołanego niedodmami, zwiększoną przepuszczalnością naczyń spotykaną w zapaleniu płuc lub zespole ostrej niewydolności oddechowej dorosłych, obniżenia ciśnienia onkotycznego w naczyniach włosowatych w zespole nerczycowym, wzrostu ciśnienia onkotycznego

w jamie opłucnej spowodowanego toksycznym obrzękiem płuc czy obecności zwiększonej ilości płynu w jamie otrzewnej w wyniku puchliny brzusznej. Natomiast wzrost objętości płynu w opłucnej, spowodowany upośledzeniem jego wchłaniania, najczęściej jest powiązany z dysfunkcją układu chłonnego opłucnej ściennej. Obecność nadmiernej ilości płynu w opłucnej powoduje zmiany objętości i pojemności płuc oraz zaburzenia wymiany gazowej [6].

Przyczyną wysięków nowotworowych w opłucnej może być niedrożność naczyń limfatycznych, uniemożliwiająca odprowadzanie płynu występująca w chłoniakach i rakach piersi, czy zamykanie światła naczyń płucnych przez komórki rakowe w raku płuca. Innymi przyczynami mogą być zmiany ciśnienia osmotycznego przestrzeni opłucnej spowodowane obecnością komórek nowotworowych, np. w raku płuca czy sutka, perforacja przewodu piersiowego obserwowana w chłoniaku czy zagnieżdżanie się na powierzchni opłucnej komórek nowotworowych guzów litych lub przerzutów, które prowadzą do zwiększonej przepuszczalności naczyń włosowatych [7].

Pod względem cytologicznym wysięki dzieli się na bogatokomórkowe i skąpokomórkowe oraz zdominowane przez jeden rodzaj komórek, np. limfocyty czy granulocyty (monomorficzne) lub zawierające mieszaninę różnych populacji komórek (polimorficzne) [6]. W płynach opłucnowych osób zdrowych zdecydowaną większość, bo ok. $\frac{3}{4}$ stanowią makrofagi a następnie $\frac{1}{4}$ limfocyty. Pojawiają się też w znikomym stopniu komórki międzybłonka [2]. Natomiast w stanach patologicznych przeważają makrofagi, monocyty, granulocyty obojętne- i kwasochłonne, limfocyty [8] oraz komórki międzybłonka [9]. Skład komórkowy wysięku można ocenić w badaniu immunofenotypowym przeprowadzonym metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem przeciwciał przeciw CD14 i CD45 (ryc. 1).



Ryc. 1. Obraz immunofenotypowy komórek wysięku opłucnowego.

Wysięki nowotworowe dodatkowo mogą zawierać komórki międzybłoniaka, pierwotnego rozrostu nowotworowego z komórek międzybłonka [10] oraz komórki przerzutów nowotworowych, głównie raków gruczołowych, rzadziej płaskonabłonkowych, drobnokomórkowych, nowotworów hematologicznych, czerniaków czy mięsaków [11].

Obecność tak bogatej mieszaniny komórek w płynach wysiękowych powiązana jest z intensywną produkcją czynników humoralnych, tj. cytokin, chemokin, czynników wzrostu oraz ich rozpuszczalnych receptorów. Stan zapalny towarzyszący wysiękom sprzyja wydzielaniu przez komórki układu immunologicznego cytokin prozapalnych, tj. $TNF-\alpha$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-11$, $IL-15$, $IL-17$, $IL-16$ [12]. Z kolei obecność komórek nowotworowych powiązana została z produkcją cytokin o charakterze immunosupresyjnym - $IL-10$, $TGF-\beta$ czy rozpuszczalnego ligandu receptora Fas (FasL) [13].

Stwierdzono, że około połowa chorujących na nowotwory z przerzutami rozwija wysięk opłucnowy. Zdecydowaną większość wszystkich wysięków nowotworowych stanowią te, towarzyszące rakom płuc, gruczołu piersiowego, jajników, trzustki, nerek, prostaty, tarczycy, oskrzela czy przewodu pokarmowego [14]. W znacznej mierze

dotyczą również nowotworów hematologicznych, tj. chłoniaków nieziarniczych, ziarnicy złośliwej [15], białaczek ostrych i przewlekłych, szpikowych i limfatycznych, zespołów mielodysplastycznych czy szpiczaka mnogiego [16]. Obecność nowotworowego wysięku opłucnowego powiązana jest z reguły z terminalnym stadium choroby i jest elementem złej prognozy, związanym z bardzo krótkim czasem przeżycia, wynoszącym średnio rok w przypadku raka piersi oraz 6 miesięcy w przypadku raka płuca [17]. Wysięk opłucnowy jest środowiskiem płynnym, pozbawionym barier łącznotkankowych. Zapewnia dobry kontakt komórek nowotworowych ze składnikami odżywczymi oraz stymulatorami wzrostu i przeżycia. Jest więc środowiskiem sprzyjającym rozwojowi populacji komórek nowotworowych [18].

2. Charakterystyka ogólna limfocytów T regulatorowych

Komórki T ograniczające odpowiedź autoimmunizacyjną odkryto ok. 40 lat temu na podstawie stwierdzenia, że noworodkowa tymektomia myszy indukuje choroby autoimmunizacyjne, a rekonstrukcja komórek T, głównie CD4+, chroni przed nimi [19]. Zaczęto też używać nazwy komórki T regulatorowe (Tregs). Subpopulacja limfocytów Treg stanowi 1-2% całej populacji obwodowych limfocytów T oraz 5-10% obwodowej populacji limfocytów T pomocniczych CD4+. Naturalne limfocyty T regulatorowe CD4+CD25+FoxP3+ (nTregs) dojrzewają w grasicy, gdzie nabierają zdolności immunosupresyjnych i migrują na obwód. W szczególnych sytuacjach Tregs nabywają zdolności supresorowych również na obwodzie po kontakcie z antygenem. Noszą one nazwę indukowanych Tregs - iTregs (Tr1, Th3, CD4+CD25-). Wykazują zdolność do proliferacji *in vivo* oraz *in vitro* w warunkach stymulacji antygenem czy w obecności IL-15 [20].

Wraz z wiekiem zaobserwowano wzrost liczby limfocytów T regulatorowych, co prowadzi do obniżenia sprawności systemu odpornościowego oraz wzrost liczby limfocytów Treg różnicujących się poza grasicą, co sprzyja wytworzeniu i utrzymaniu antygenowo swoistej tolerancji ułatwiającej rozwój nowotworów [21,22].

2.1. Immunofenotyp limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+

Tregs wykazują powierzchniową ekspresję CD4. Charakteryzują się też wysoką ekspresją łańcucha α receptora dla IL-2 (CD25^{hi}) [23].

Markerami częściowo swoistymi dla nTreg są: CD45RO, CTLA-4 (*ang. cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4*) [24], GITR (*ang. glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor – related protein*) [25] oraz neuropilina-1 [26]. Jednak obecność CD25, CTLA-4 czy GITR wykazano również na powierzchni aktywowanych limfocytów T efektorowych, co uniemożliwia traktowanie ich jako cząsteczek swoistych wyłącznie dla Tregs [19].

Za najbardziej swoisty marker komórek T regulatorowych CD4+CD25+ uważa się wewnątrzkomórkowy czynnik transkrypcyjny FoxP3 (*ang. forkhead box P3*) (represor transkrypcji IL-2) będący głównym regulatorem ich rozwoju i funkcji [27,28], cząsteczkę LAG-3 (CD223) będącą homologiem CD4 negatywnie regulującym ekspansję limfocytów T i ich homeostazę [29] oraz brak receptora dla IL-7 (IL-7R) – CD127 [30].

Ponadto, nTreg posiadają na swojej powierzchni szereg molekuł adhezyjnych (CD11a – LFA-1, CD44, CD54 – ICAM-1, CD103 – $\alpha_E\beta_7$ integryna, CD58 – LFA-3), odpowiadających za kontakt z komórkami prezentującymi antygen (*ang. antigen presenting cells, APC*) [31]. Cząsteczki odpowiadające za aktywną migrację, w tym receptory dla chemokin (CCR4, CCR8, CCR5, CXCR4) [32] oraz CD62L, umożliwiającą migrację limfocytów T z grasicy do węzłów chłonnych [23]. Za cząsteczki odpowiedzialne za aktywację i proliferację nTregs uważa się CD5 i CD71 (receptor dla transferyny) [31].

Komórki T regulatorowe posiadają również cząsteczki charakterystyczne dla profesjonalnych APC tj. receptory Toll-podobne (TLR4, 5, 7 i 8) [33] oraz HLA-DR [24].

2.2. Funkcje limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+

Podstawową funkcją limfocytów T regulatorowych jest utrzymanie obwodowej tolerancji immunologicznej i supresja odpowiedzi immunologicznej. Wiąże się to ze zdolnością do zapobiegania patologicznej reakcji immunologicznej przeciw florze bakteryjnej organizmu, wpływem na tolerancję przeszczepów, zapewnieniu naturalnej

tolerancji organizmu matki na obecność płodu podczas ciąży oraz regulacji przebiegu odpowiedzi przeciwinfekcyjnej – wygaszeniu odpowiedzi immunologicznej [34].

Wszystko to jest możliwe dzięki zdolności do hamowania aktywności innych limfocytów. Początkowo uważano, że limfocyty T regulatorowe pełnią funkcje supresorowe tylko względem limfocytów T, hamując proliferację naiwnych limfocytów T oraz hamując wydzielanie IL-2 przez limfocyty efektorowe, co pozbawiało je ich aktywności. Obecnie wiadomo, że mogą one również hamować proliferację prezentujących antygen limfocytów B. Odbywa się to dzięki bezpośrednim kontaktom międzykomórkowym i wydzielaniu przez limfocyty T regulatorowe czynników cytotoksycznych tj. perforyn i granzymów [35]. Mogą one też hamować wytwarzanie i zmianę klas przeciwciał produkowanych przez limfocyty B, ponieważ są one obecne w strefach komórek B i ośrodkach rozmnażania wtórnych narządów limfatycznych, gdzie po kontakcie komórek T i B następuje inicjacja odpowiedzi humoralnej [36].

Stwierdzono, że zaburzenia w rozwoju lub funkcji tych komórek są przyczyną chorób autoimmunizacyjnych u ludzi i zwierząt. Mutacje w ludzkim genie *FOXP3*, występującym na chromosomie X, są przyczyną ciężkiego płodowego zaburzenia autoimmunizacyjnego zwanego IPEX (ang. *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*). Usunięcie naturalnych Tregs z użyciem przeciwciał monoklonalnych przeciw CD25 indukuje u myszy choroby o podłożu autoimmunizacyjnym i zapalnym [37].

2.3. Inne typy limfocytów T regulatorowych

2.3.1. Komórki Tr1

Oprócz naturalnych CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs, które podobnie jak inne limfocyty T, dojrzewają w grasicy, Tregs mogą być także indukowane na obwodzie pod wpływem ciągłej stymulacji antygenami prezentowanymi przez MHC II [38]. Antygenowa stymulacja w obecności IL-10 naiwnych komórek T *in vitro* indukuje powstanie Tregs typu 1 (Tr1). Inhibicja limfocytów Th1 i Th2 z ich udziałem przebiega na drodze mechanizmu zależnego od cytokin [39]. Komórki Tr1 nie wykazują ekspresji FoxP3 lub wyłącznie przejściowo [40] ale produkują duże ilości IL-10 i TGF-β [20], będących głównymi czynnikami immunosupresyjnymi oraz INF-γ.

2.3.2. Komórki Th3

Antygenowa stymulacja naiwnych komórek T w obecności TGF- β indukuje powstanie komórek pomocniczych T 3 (Th3) *in vivo* i *in vitro*, które produkują TGF- β [41,42], IL-4 i IL-10 [39]. Podobnie jak komórki Tr1, Th3 wykazują aktywność inhibitorową zależną od cytokin [39]. Przynajmniej w niektórych komórkach Th3 TGF- β może indukować ekspresję FoxP3. Wykazano również, że IL-4 i IL-13 mogą prowadzić do powstawania Foxp3⁺ Th3 z naiwnych komórek T CD4⁺ w procesie, który jest niezależny od IL-10 lub TGF- β [41].

2.3.3. Komórki CD8+

Nie tylko komórki CD4⁺ mogą wykazywać aktywność immunosupresyjną. W kilku pracach opisano CD8⁺ Tregs, działające w sposób zależny od antygeny. Komórki CD8⁺CD28⁻ mogą hamować komórki prezentujące antygen, w tym komórki dendrytyczne, posiadające ten sam kompleks antygen/MHC, który je wzbudził [43]. Niektóre spośród nich mogą produkować IL-10 lub TGF- β , ograniczając tym samym aktywację i proliferację naiwnych komórek T CD8⁺. Antygenowa immunizacja powoduje rozrost zarówno CD4⁺Foxp3⁺ Tregs jak i CD8⁺Foxp3⁺ Tregs *in vivo* [44].

2.3.4. Komórki CD4-CD8- (DN)

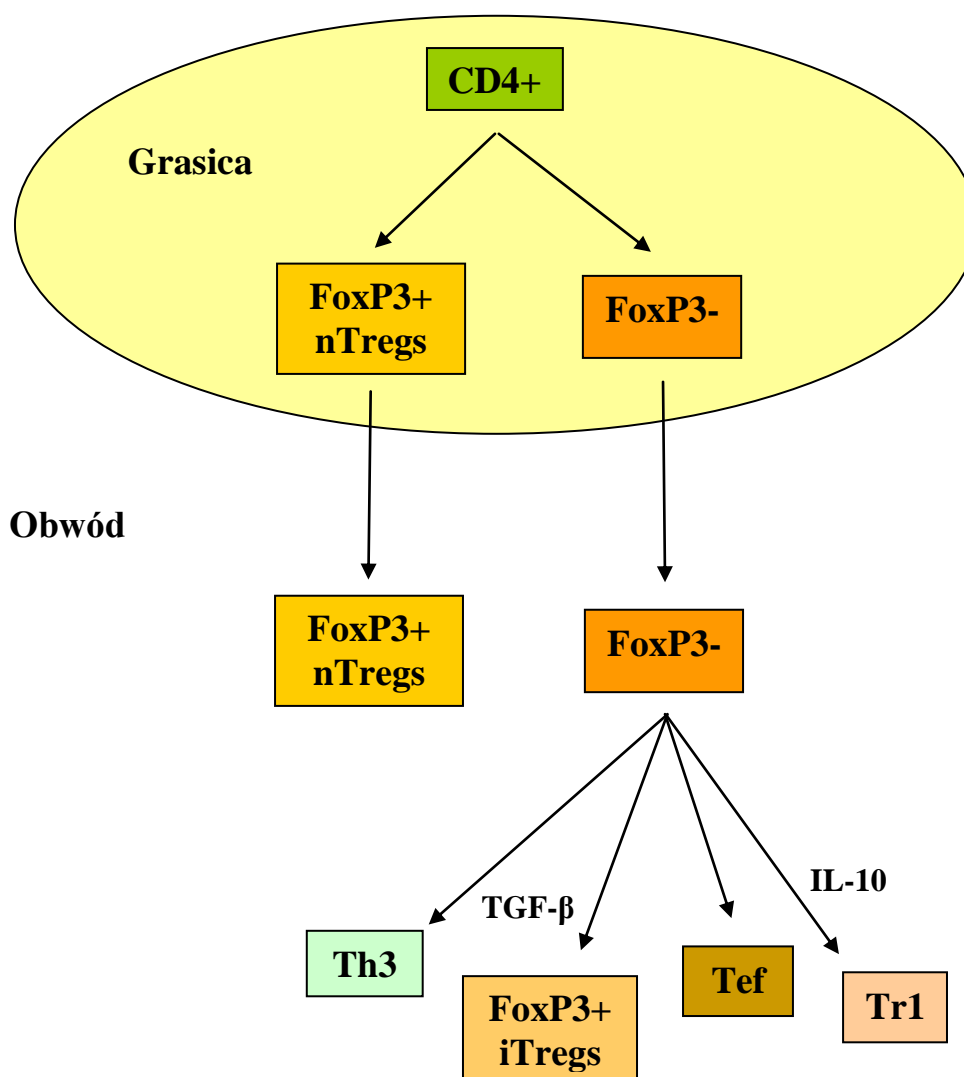
Podwójnie ujemne CD4⁻ CD8⁻ (DN) Tregs stanowią 1–3% obwodowych limfocytów u myszy. DN Tregs są zdolne do supresji allogenicznej odpowiedzi komórek T *in vitro* i do przedłużenia przeżycia przeszczepu allogenicznego *in vivo* [45]. Podobną populację DN Tregs zidentyfikowano również u ludzi. Komórki te mogą ograniczać wywołaną antygenem aktywację i proliferację komórek T [46].

2.3.5. Komórki T $\gamma\delta$

Zidentyfikowano również małą populację ludzkich komórek T, których receptory TCR są zbudowane z łańcuchów γ i δ . Są one odmienne od komórek T z łańcuchami $\alpha\beta$ i mogą spełniać funkcje komórek prezentujących antygen oraz komórek regulatorowych [47], zdolnych do supresji odpowiedzi naiwnych

i efektorowych komórek T oraz blokowania dojrzewania i funkcji komórek dendrytycznych [48]. $T\gamma\delta$ Tregs mogą występować w skórze, jelicie, guzach litych oraz naciekać guzy sutka i odpowiadać za ich aktywność immunosupresyjną *in vivo* [47-49].

Różnicowanie komórek $CD4^+$ w główne subpopulacje limfocytów T regulatorowych oraz limfocyty T efektorowe zostało zobrazowane na ryc. 2.



Ryc. 2. Schemat różnicowania komórek $CD4^+$ w główne subpopulacje limfocytów T regulatorowych oraz limfocyty T efektorowe.

3. **Rozwój i aktywność limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+**

Dojrzewające w grasicy tymocyty CD4+CD25+FoxP3+ wykazują pełną aktywność regulatorową a powstają na skutek oddziaływań o wysokim powinowactwie z autoantygenami prezentowanymi przez zrębowe komórki grasicy. W przeciwieństwie do tego co zaobserwowano *in vitro* limfocyty T regulatorowe wykazują zdolność do znacznej proliferacji *in vivo* wysoce zależnej od obecności swoistych antygenów [38].

Tregs nie mają zdolności do zapobiegania pierwotnej aktywacji receptorów efektorowych limfocytów T (TCR) ani wczesnej produkcji IL-2 przez te limfocyty, jednakże w wyniku ekspansji Tregs spowodowanej kontaktem z antygenem dochodzi do hamowania przebiegającej odpowiedzi immunologicznej. Raz aktywowane (specyficznym ligandem) mają zdolność do hamowania aktywności innych komórek efektorowych – blokowania produkcji IL-2 (komórki Treg oraz Tef nie muszą rozpoznawać antygenów na powierzchni tych samych APC) [50].

Rozwój i aktywność Tregs są wysoce zależne od obecności molekuł kostymulujących, tj. CTLA-4, CD28 czy GITR [25,51].

3.1. **Wpływ FoxP3 na rozwój i aktywację limfocytów T regulatorowych**

FoxP3 (*ang. forkhead box P3*) jest białkiem z rodziny regulatorów transkrypcji Fox, odpowiedzialnym za wiązanie do DNA i regulację transkrypcji. Gen *FOXP3* zlokalizowany jest na Xp11.23 i składa się ze 144 kbp oraz zawiera 11 kodujących regionów. Białko FoxP3 charakteryzuje się konserwatywną 110-aminokwasową domeną odpowiedzialną za wiązanie do DNA (winged helix domain).

Wykazano, że poziom mRNA FoxP3 jest 100 krotnie wyższy w komórkach CD4+CD25+ w stosunku do komórek nie zawierających cząsteczki CD25 zarówno w grasicy jak i na obwodzie. Na tej podstawie uznano go za czynnik kontrolujący powstawanie i różnicowanie Tregs. Poziom ekspresji FoxP3 jest stały w komórkach CD4+CD25+ bez względu na sposób oraz stan ich aktywacji [27,52].

Transfekcja naiwnych limfocytów T genem *FOXP3* powoduje spadek ich wrażliwości na stymulację przez TCR, hamuje produkcję cytokin oraz wzmacnia ekspresję cząsteczek charakterystycznych dla nTregs. Ponadto transfekowane komórki zyskują inhibitorowe zdolności nTregs [53].

Myszy “scurfy”, charakteryzujące się brakiem funkcjonalnego białka FoxP3 wykazują nadwrażliwość limfocytów CD4+ na stymulację TCR oraz nadprodukcję cytokin. Limfocyty T tych myszy cechują się znacznym wzrostem aktywności NFAT (*ang. nuclear factor of activated T cells*) i NF-κB w porównaniu z limfocytami T myszy typu dzikiego. Fakt ten powiązano z udziałem czynnika transkrypcyjnego FoxP3 w hamowaniu produkcji cytokin tj. IL-2, IL-4 i INF-γ przez komórki T pomocnicze. Mało wiadomo na temat tego biochemicznego mechanizmu ale podejrzewa się, że odbywa się to na drodze wiązania i supresji dwóch kluczowych dla ekspresji cytokin czynników transkrypcyjnych - NFAT i NF-κB z rodziny REL poprzez pierwsze 200 aminokwasów na końcu N białka FoxP3. Blokowanie czynnika NFAT (*ang. nuclear factor of activated T cells*) uniemożliwia mu aktywację transkrypcji IL-4 a z kolei wiązanie FoxP3 do czynnika NFκB blokuje jego zdolność do aktywacji transkrypcji antyapoptotycznego genu A20 [54].

Z kolei mutacje w genie *FOXP3* skutkują rozwojem chorób autoimmunologicznych (cukrzyca typu I), chronicznych stanów zapalnych (alergie, enteropatie) oraz brakiem tolerancji przeszczepów. Całkowita eliminacja czynnika FoxP3 (knock-out genu) hamuje rozwój Tregs i wywołuje letalne choroby zapalne [38].

Pomimo powiązań ekspresji FoxP3 w komórkach CD4+ z aktywną immunosupresją, istnieją dane mówiące o innych funkcjach komórek FoxP3+ w układzie odpornościowym [50]. Obecność komórek FoxP3+ *in vivo* może być spowodowana wystąpieniem stanu zapalnego, indukującego ekspresję FoxP3 w aktywowanych komórkach (iTregs), bądź proliferację nTregs, niekoniecznie zaś aktywną inhibicję odpowiedzi zapalnej. Ponadto, komórki FoxP3+ mogą się przekształcać w komórki efektorowe i produkować cytokiny w warunkach prozapalnych [55]. Z drugiej strony, zarówno komórki iTreg jak i nTreg mogą przejawiać niestabilną ekspresję FoxP3 *in vivo* a jego obecność nie jest bezwzględnym warunkiem aktywności supresorowej limfocytów T. Zidentyfikowano dotąd różne subpopulacje Tregs, które nie wykazują ekspresji FoxP3, bądź jest ona obecna na niskim poziomie [56]. Należy zatem ostrożnie interpretować wyniki badań definiujących komórki Treg w różnych jednostkach chorobowych wyłącznie na podstawie obecności czynnika transkrypcyjnego FoxP3 [57].

3.2. Rola TGF- β w indukcji ekspresji FoxP3 i funkcji limfocytów T regulatorowych

Możliwe jest indukowanie ekspresji FoxP3 w naiwnych limfocytach CD4+CD25- i ich transformacja w komórki CD4+CD25+FoxP3+ o aktywności regulatorowej *in vitro* i *in vivo* (zjawisko tolerancji infekcyjnej). Zdolność tę posiada TGF- β (*ang. transforming growth factor – β*) [58]. Tregs indukowane obecnością TGF- β (iTregs) przypominają te wywodzące się z grasicy, jako że są anergiczne, supresorowe i produkują małe ilości cytokin. iTregs przekształcone z obwodowych CD4+FoxP3- komórek T są w stanie zahamować wszystkie objawy chorób autoimmunizacyjnych (stan zapalny okrężnicy) po transferze do myszy RAG-/- [59]. Obserwacje prowadzone na cukrzykach, wykazały, że ciągła ekspresja TGF- β w wyspach Langerhansa hamowała chorobę poprzez lokalną ekspansję komórek CD4+CD25+FoxP3+ [60]. Co więcej, wykazano że tolerancja przeszczepu skóry jest znacznie wyższa u pacjentów otrzymujących TGF- β [61].

Podejrzewa się również, że dzięki obecności błonowego TGF- β limfocyty CD4+CD25+FoxP3+ mogą indukować ekspresję FoxP3, a co za tym idzie właściwości regulatorowe wśród sąsiadujących komórek CD4+CD25- na zasadzie bezpośrednich kontaktów międzykomórkowych [62,63].

TGF- β produkowany przez limfocyty T jest zbędny dla utrzymania żywotności Tregs ale jest kluczowy dla pełnienia przez nie funkcji inhibitorowych. Dowiedziono tego inaktywując TGF- β w obwodowych limfocytach CD4+ i CD8+ u myszy, co w szóstym miesiącu życia doprowadziło do rozwoju śmiertelnego IBD [59,64].

W warunkach *in vitro* supresja nie jest zależna wyłącznie od wydzielanego TGF- β , ponieważ wymagany jest bezpośredni kontakt komórki supresorowej i efektorowej. Model proponowany przez Nakamure postuluje obecność błonowej, latentnej formy TGF- β na powierzchni komórek T regulatorowych oddziałującej z receptorem na powierzchni docelowych komórek T FoxP3-. TGF- β w formie aktywnej jak i latentnej, powiązanej z peptydem LAP (latency-associated peptide) wykazano wyłącznie na powierzchni aktywowanych Tregs. Zespół Nakamury wykazał również, iż Tregs hamowały produkcję przeciwciał przez komórki B a użycie przeciwciał przeciw TGF- β znosiło ich supresyjną aktywność [62].

Natomiast w warunkach *in vivo* wykazano prawidłowy rozwój komórek Treg u myszy TGF- β -/- a produkcja TGF- β przez komórki regulatorowe okazała się

niekonieczna do hamowania zapalenia w tym modelu eksperymentalnym. Na przykładzie zapalenia okrężnicy dowiedziono, że TGF- β odgrywa kluczową rolę w hamowaniu odpowiedzi zapalnej, niemniej nie musi być on produkowany przez Tregs. Podejrzewa się, że Treg mogą indukować produkcję TGF- β w innych limfoidalnych jak i nielimfoidalnych komórkach [59].

3.3. Wpływ IL-7 na dojrzewanie limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+

CD4+ i FoxP3+ limfocyty regulatorowe występują jako dwa typy komórek w zależności od środowiska, w którym nabierają zdolności inhibitorowych. Pierwsze z nich - nTregs powstają w grasicy i od początku posiadają właściwości supresorowe, drugie - adoptywne powstają z komórek CD4+FoxP3- na obwodzie po kontakcie z antygenem [65]. Obie subpopulacje posiadają na swojej powierzchni cząsteczkę CD25, odgrywającą istotną rolę dla ich przetrwania i umożliwiającą konkurowanie o IL-2 niezbędną dla przetrwania i funkcji komórek efektorowych [66]. Jednakże na obwodzie przetrwanie i aktywność naturalnych i adoptywnych Tregs nie zależą wyłącznie od IL-2 a w przypadku jej braku podejrzewa się, że są uwarunkowane obecnością innych cytokin, których receptory zawierają łańcuch γ , w tym IL-7. Wiąże się to z obecnością receptora dla IL-7 – cząsteczki CD127 na powierzchni Tregs. Początkowo jej brak uważano za jeden z markerów limfocytów T regulatorowych, natomiast teraz wykazano, iż komórki CD25+CD127+ mogą także zawierać czynnik transkrypcyjny FoxP3 i być w pełni funkcjonalnymi komórkami supresorowymi. Jedną z hipotez mówi, że są one subpopulacją komórek „pre-Treg”, która wymaga ekspozycji na cytokiny (IL-2 lub IL-7) aby w pełni dojrzeć i nabyć właściwości regulatorowych. Wykazano, że IL-7 aktywuje przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji-5 (STAT-5), wiążący się do promotora genu *FOXP3* i wzmagający jego ekspresję *in vitro* i *in vivo* [67]. W efekcie tego zjawiska powstają komórki CD25+CD127+FoxP3+, w których następnie obniżeniu ulega ekspresja receptora dla IL-7 i przekształcają się one w tradycyjne komórki CD25+CD127-FoxP3+. Tym samym IL-7 jest cytokiną promującą przetrwanie i funkcje supresorowe Tregs [56].

3.4. Interakcje limfocytów T regulatorowych z komórkami prezentującymi antygen

Komórki dendrytyczne należą do profesjonalnych APC. Tolerancja lub odpowiedź immunologiczna uzależniona jest od stanu dojrzałości tychże komórek. Niedojrzałe komórki dendrytyczne charakteryzują się ekspresją cząsteczki CD80 z rodziny cząsteczek B7. W miarę dojrzewania wzrasta na nich ekspresja cząsteczki CD86. Kontakt limfocytów Treg z CD80 nasila a z CD86 hamuje ich funkcje supresorowe [68,69].

Przy braku infekcji APC cechuje podstawowy poziom ekspresji cząsteczek CD80/86 i niski MHC II. Dzięki temu ich zdolność prezentacji autoantygenów przez APC jest niska. Limfocyty Treg rozpoznające autoantygeny mogą jednak ulec aktywacji za pośrednictwem kostymulującego sygnału cząsteczki CTLA-4 wiążącej się z bardzo dużym powinowactwem do CD80/86. Dzięki temu dochodzi do supresji czynności limfocytów autoreaktywnych. Sytuacja zmienia się jednak podczas infekcji, gdy występuje konieczność aktywacji i ekspansji komórek efektorowych. Dochodzi wówczas do wzrostu poziomu ekspresji cząsteczek CD80/86 i MHC II na APC a aktywność supresyjna limfocytów Treg jest obniżana za pośrednictwem cząsteczki CD28 o powinowactwie do CD80/86 oraz GITR i IL-2. Oprócz tego, poziom supresji jest determinowany przez siłę sygnału pochodzącego z TCR komórek efektorowych. Słaby sygnał sprawia, że komórki efektorowe są podatne na supresję, natomiast silny sygnał zwiększa ich oporność na supresję. Wraz ze spadkiem aktywacji APC i eliminacji czynnika infekcyjnego właściwości supresorowe komórek regulatorowych są przywracane [68,69].

4. Mechanizmy blokowania odpowiedzi przeciwnowotworowej z udziałem komórek T regulatorowych

Określono różne mechanizmy aktywności immunosupresyjnej komórek Treg, w tym przebiegające na drodze humoralnej z udziałem czynników rozpuszczalnych oraz na drodze blokowania limfocytów T zależnego od cząsteczek powierzchniowych i APC [70,71].

4.1. Mechanizm z udziałem cytokin blokujących

Tregs mogą wydzielać cytokiny blokujące, jak IL-10, TGF- β i IL-35 i wykorzystywać je jako główne czynniki wzbudzania immunosupresji. Są one produkowane w dużej mierze przez niedojrzałe APC zlokalizowane w przewodzie pokarmowym, układzie oddechowym i kobiecych drogach rodnych. Ulegają tam one ciągłej ekspozycji na antygeny, w wyniku czego mogą zarówno brać udział w przekształcaniu komórek efektorowych w supresorowe, jak i ograniczać dostęp komórek potencjalnie patogennych [34].

IL-10 bierze udział w kontroli odpowiedzi wrodzonej poprzez hamowanie lokalnej i systemowej akumulacji komórek biorących w niej udział oraz odgrywa rolę w powstawaniu subpopulacji limfocytów regulatorowych Tr1. Część komórek regulatorowych przejawia obecność związanego z błoną TGF- β (jego brak prowadzi do wykorzystania wolnego TGF- β). Mutacje w genie receptora dla TGF- β powodują niewrażliwość komórek na działanie TGF- β i ucieczkę spod kontroli Tregs. TGF- β może bezpośrednio oddziaływać na potencjalnie patogenne komórki efektorowe, blokując ich różnicowanie i funkcje efektorowe lub wywoływać w nich ekspresję FoxP3 i funkcje regulatorowe [72].

Znaczenie IL-10 i TGF- β w regulacji odpowiedzi immunologicznej określono na modelach zwierzęcych. Myszy *IL10*^{-/-} i *TGF- β* ^{-/-} rozwijają choroby zapalne z niekontrolowaną odpowiedzią immunologiczną. Udział tych cytokin w funkcjonowaniu Tregs udokumentowano na podstawie stwierdzenia, że CD4⁺CD25⁺ Tregs uzyskane z myszy *IL10*^{-/-} lub *TGF- β* ^{-/-} były mniej skuteczne niż naturalne Tregs w zapobieganiu rozwojowi choroby zapalnej jelit (IBD), która może być indukowana przez adoptywny transfer naiwnych CD4⁺CD25⁻ komórek T do myszy limfopenicznych *Rag*^{-/-} lub SCID. Oprócz tego IL-10 i TGF- β odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu reakcji alergicznych z udziałem Tregs. Wydaje się też, że IL-10 i TGF- β są ważnymi mediatorami w ochronie przeciw eksperymentalnej autoimmunologicznej encefalomyelitis (EAE) [73], mysim modelu używanym do badań ludzkiego stwardnienia rozsianego (MS). Badania przeprowadzone na myszach NOD wykazały, że Tregs wykorzystują TGF- β do ograniczania rozwoju cukrzycy typu I [74,75]. Ponieważ Tregs są zaangażowane w indukcję tolerancji na nowotwór [70,71,76], znaczenie IL-10 i TGF- β dla funkcji Tregs badano zarówno u chorych na nowotwór jak i na modelach mysich nowotworów. W badaniach wykorzystujących

model nowotworów indukowanych UV i myszy *IL10*^{-/-} wykazano, że IL-10 odgrywa kluczową rolę w supresji mediowanej przez CD4⁺CD25⁺ Tregs [77].

W badaniach wykorzystujących antygenowo swoisty model mysiego raka jelita grubego wykazano, że CD4⁺CD25⁺ Tregs znoszą odrzucenie guza z udziałem CD8⁺ komórek T przez swoistą supresję cytotoksyczności nowotworowo swoistych komórek CD8⁺. TGF- β wydaje się być niezbędny dla supresji ponieważ ekspresja dominująco-negatywnego receptora TGF- β przez komórki CD8⁺ powoduje ich oporność na supresję zależną od Tregs. Te odporne na Tregs komórki CD8⁺ cechuje niezaburzona cytotoksyczność, co jest związane z nasiloną zdolnością do niszczenia komórek nowotworowych [72]. Wykazano też, że peptyd blokujący, który wiąże TGF- β z powierzchnią Tregs, może nasilać odpowiedź przeciwnowotworową przez blokowanie funkcji Tregs [78]. Zaobserwowano również odwrotną zależność między aktywacją komórek NK i ekspansją Tregs u chorych z GIST (gastrointestinal stromal tumor). Stwierdzono, że ludzkie Tregs wykorzystują błonowe wiązanie TGF- β do bezpośredniego blokowania funkcji efektorowych komórek NK i blokowania receptorów NKG2D na powierzchni tych komórek [79]. Mogą więc Tregs wykorzystywać TGF- β do eliminowania zarówno komórek T CD8⁺ jak i NK z odpowiedzi przeciwnowotworowej. Badania nad Tregs uzyskanymi od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi wykazały, że ludzkie Tregs są zdolne do supresji odpowiedzi przeciwnowotworowej z udziałem mechanizmów zależnych od IL-10 jak i TGF- β [80]. W uzupełnieniu do nich, wykazano, że mysie Tregs produkują nową blokującą cytokinę, IL-35. Odgrywa ona ważną rolę w przebiegającym z udziałem Tregs łagodzeniu IBD [81]. Nie jest jednak konstytutywnie ekspozowana przez ludzkie Tregs [82]. Myszy z niedoborem IL-35 nie wykazują objawów chorób zapalnych lub autoimmunizacyjnych [83]. Nie ukazały się doniesienia na temat znaczenia IL-35 w funkcjonowaniu Tregs w przebiegu chorób nowotworowych.

Dowiedziano, że cytokiny immunosupresyjne nie są jedynym mechanizmem immunosupresji, ponieważ limfocyty Treg u myszy z delecją genów kodujących każdą z cząsteczek nadal pozostawały funkcjonalne [34].

4.2. Mechanizm z udziałem cytotoksyczności

Komórki T CD8⁺ i komórki NK na drodze perforynowo/granzymowej eliminują komórki zakażone przez wewnątrzkomórkowe patogeny lub komórki nowotworowe. Te

cytotoksyczne limfocyty wykorzystują perforynę do transportu granzymów do komórek docelowych, gdzie granzymy A i B indukują apoptozę na drodze degradacji DNA. Myszy z niedoborem perforyny (*Prfl*^{-/-}) są bardziej podatne na spontaniczne chłoniaki, co sugeruje, że droga perforynowo/granzymowa odgrywa istotną rolę w nadzorze immunologicznym w niektórych typach nowotworów [84]. Jednak ostatnie badania sugerują, że Tregs mogą wykorzystywać cytotoksyczność z udziałem perforyny i granzymów jako mechanizm supresji. Wykazano, że ludzkie Tregs aktywowane przez przeciwciała przeciw CD3 i przeciw CD46 wykazują ekspresję granzymów A i B i mogą zabijać autologiczne komórki układu odpornościowego. To zabijanie z udziałem Tregs jest zależne od perforyny i niezależne od FasL. Komórki CD4⁺ i CD8⁺ stymulowane przez przeciwciała monoklonalne przeciw CD3/CD28 (jak też niedojrzałe mieloidalne komórki dendrytyczne i monocyty) są szczególnie wrażliwe na lizę zależną od Treg [85]. Podobnie, aktywowane Tregs blokują proliferację limfocytów B stymulowanych LPS i indukują ich śmierć. Komórki te wykazują ekspresję granzymu B i perforyn [35]. W badaniach *in vivo*, z wykorzystaniem systemu inokulacji guza i adoptywnego transferu Tregs wykazano, że droga perforynowo-granzymowa odgrywa kluczową rolę w supresji odpowiedzi na nowotwór z udziałem Tregs. Wykazano również, że o ile granzym B jest nieobecny w spoczynkowych Tregs u myszy, to jest indukowany przez lokalne czynniki w mikrośrodowisku guza [85]. Oprócz perforyn i granzymów wykazano, że Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ uzyskane od chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, w przeciwieństwie do izolowanych od zdrowych dawców, wykazują ekspresję FasL. Komórki te pod wpływem aktywacji i wysokich dawek IL-2, mogą eliminować autologiczne komórki CD8⁺ (ale nie CD4⁺) na drodze apoptozy z udziałem Fas/FasL [86]. Wykazano również, że aktywowane *in vitro* mysie Tregs mogą indukować apoptozę komórek efektorowych CD4⁺ z udziałem TRAIL/DR5 (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand/death receptor 5) [87].

4.3. Mechanizm z udziałem cząsteczek powierzchniowych

Inhibitorowy efekt wywierany przez komórki Treg jest uzależniony od ekspresji dwóch cząsteczek. Są to łańcuch α receptora dla IL-2 (CD25) oraz cząsteczka CTLA-4 (CD152). Pierwszy z nich uczestniczy w bezpośrednim mechanizmie inhibicji, druga w pośrednim, wpływając na APC [50,88].

4.3.1. **Udział CD25 w bezpośrednim mechanizmie inhibicji**

Jedną z podstawowych cech charakteryzujących komórki Treg jest wysoka ekspresja łańcucha α receptora dla IL-2 (CD25). Same Tregs nie produkują IL-2 ale jej obecność wytwarzana przez aktywowane lub autoreaktywne limfocyty T oraz DC jest niezbędna dla ich funkcji supresorowych i przeżycia [89]. Sąsiedztwo komórek regulatorowych pozbawia więc komórki efektorowe podstawowego czynnika wzrostu, prowadzi do zahamowania ich proliferacji i apoptozy [50]. Proces ten przebiega bez obecności APC i można go określić mianem delecji poliklonalnej (ang. *polyclonal deletion*, PCD), jako że supresja przebiegająca z udziałem Tregs nie jest antygenowo-zależna [88]. PCD nie obejmuje też procesów cytolitycznych (np. aktywacji białka Fas), bezpośrednich kontaktów komórkowych ani mechanizmów zależnych od granzymów, cząsteczek z rodziny receptorów TNF czy perforyn [57].

Proces pozbawiania komórek efektorowych cytokin przebiega dwojako. Po pierwsze, Tregs konsumują czynniki wzrostu wydzielane przez sąsiadujące komórki efektorowe we wczesnej fazie aktywacji. Po drugie, ograniczają zdolność samych Tef do produkcji cytokin w późniejszej fazie aktywacji. Dzieje się tak, ponieważ pozbawione IL-2 Tef nie są stymulowane na drodze dodatniego sprzężenia zwrotnego do wzmożonej produkcji cytokin. Proces ten, bez udziału Tregs, ma początek we wczesnej fazie aktywacji kiedy limfocyty Th0 w dużych ilościach produkują IL-2. Aktywuje to ekspresję receptorów dla IL-2 o wysokim powinowactwie, co wzmacnia wrażliwość na nią komórek efektorowych. Efektem końcowym jest produkcja innych cytokin, proliferacja i aktywacja komórek efektorowych [50].

W wyniku spadku poziomu cytokin dochodzi do aktywacji białka Bim należącego do rodziny Bcl-2 oraz aktywacji apoptozy od niego zależnej. Jest ono odpowiedzialne za apoptozę w wielu komórkach hematopoetycznych zależnych od cytokin wzrostu i przeżycia [90]. Fakt ten potwierdziły eksperymenty z udziałem myszy ze znokautowanym genem *Bim* (*Bim-KO*), których limfocyty efektorowe opierały się supresji z udziałem aktywowanych Tregs aktywnie produkując cytokiny nawet w późnej fazie aktywacji. Potwierdza to hipotezę, że Tregs wpływają na zależną od cytokin proliferację efektorowych limfocytów T poprzez zabijanie ich w sposób antygenowo-niezależny *in vivo* [57].

Wydaje się jednak, że Tregs mogą prowadzić do śmierci komórek efektorowych na drodze zużycia innych, poza IL-2, cytokin, jako że pozostawały one zdolne do supresji komórek efektorowych ze znokautowanym genem *IL-2* (*IL-2* KO). Podejrzewa się, że może to dotyczyć cytokin kluczowych dla przeżycia Tregs, czyli tych, których receptory posiadają łańcuch γ , tj. IL-4 czy IL-15. Zaobserwowano, że dodatek tych cytokin chronił komórki efektorowe przed apoptozą *in vitro* [91].

Poziom cytokin i obecność białka Bim wpływają również na przeżycie samych limfocytów T regulatorowych, które w sytuacji deficytu cytokin, których receptory posiadają łańcuch γ giną na drodze apoptozy [91].

4.3.2. Pośredni mechanizm z udziałem blokowania komórek prezentujących antygen

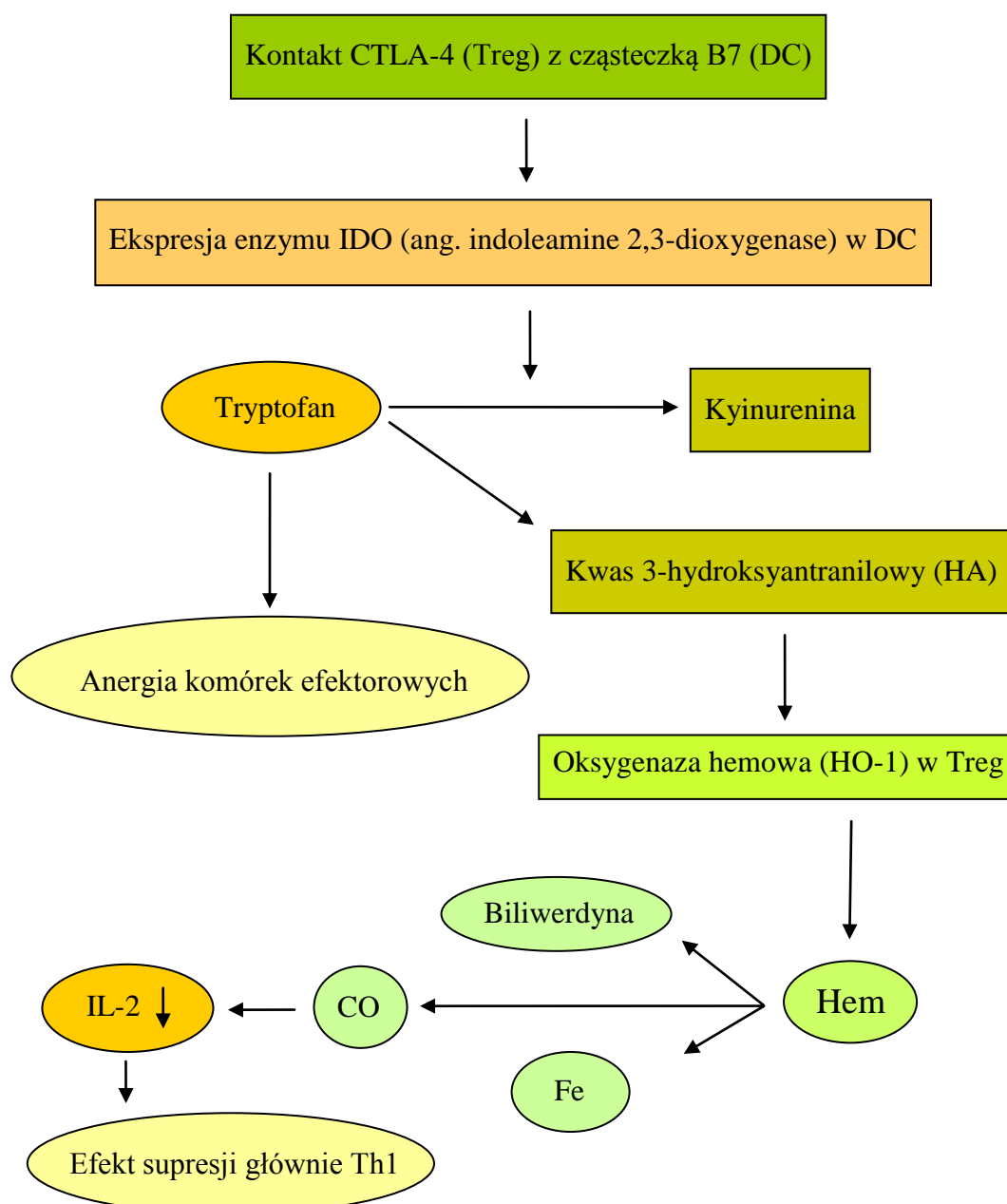
Drugim, pośrednim sposobem ograniczania odpowiedzi immunologicznej z udziałem Tregs jest ich wpływ na APC, w tym DC. W badaniach wzajemnych oddziaływań Tregs, Tef i DC w środowisku węzłów chłonnych z zastosowaniem mikroskopii przyżyciowej wykazano, że o ile aktywność Tef jest ograniczana w obecności wzrastającej liczby Tregs, to nie stwierdzono stabilnych asocjacji między tymi komórkami. Natomiast Tregs są zdolne do bezpośrednich interakcji z DC wiążącymi antygen, ograniczając tworzenie się stabilnych związków między Tef i DC w czasie prezentacji antygenu [92]. Wydaje się, że stały kontakt Treg - DC prowadzi do zablokowania aktywacji Tef [93].

Limfocyty Treg wpływają na komórki APC za pośrednictwem cząsteczki CTLA-4. Wykazano, że swoisty niedobór CTLA-4 w Tregs jest przyczyną spontanicznego rozwoju systemowych chorób limfoproliferacyjnych i autoimmunizacyjnych u myszy. Ponadto, może on indukować silną odpowiedź przeciwnowotworową przez osłabienie supresorowych właściwości Tregs. Jest więc CTLA-4 podstawową cząsteczką efektorową odpowiedzialną za wzbudzenie tolerancji, w tym także tolerancji na nowotwór [94] (ryc. 3).

4.3.2.1. Ekspresja enzymuIDO i rozkład tryptofanu

Oprócz ograniczania zdolności APC do aktywowania innych komórek T, interakcje CTLA-4 na powierzchni Tregs z jej ligandami z grupy B7 na powierzchni

APC prowadzą do produkcji enzymuIDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) przez te drugie. Jest to enzym odpowiedzialny za rozpad tryptofanu, aminokwasu kluczowego dla proliferacji limfocytów T [95]. Degradacja tryptofanu generuje ponadto proapoptotyczne metabolity i blokuje na poziomie transkrypcji produkcję IL-2 przez komórki CD25- [96]. IDO powoduje zatem supresję komórek T (głównie Th1) i promuje tolerancję guza (ryc. 3).



Ryc. 3. Przebieg supresji limfocytów T efektorowych na drodze oddziaływań CTLA-4/B7.

Plazmocytoidalne komórki dendrytyczne produkująceIDO izolowane z zajętych przez nowotwór węzłów chłonnych są zdolne do bezpośredniego aktywowania Tregs w warunkach restrykcji MHC na drodze zależnej od CTLA-4. Aktywowane Tregs powodują wzrost ekspresji ligandów programowanej śmierci 1 i 2 (PD-L1 i PD-L2) na komórkach dendrytycznych, co prowadzi do blokowania odpowiedzi ze strony efektorowych komórek T [97]. Te badania sugerują, że dodatnie sprzężenie zwrotne między komórkami dendrytycznymi wykazującymi ekspresjęIDO i Tregs wykazującymi ekspresję CTLA-4 może prowadzić do zablokowania efektorowych komórek T i spowodować immunotolerancję guza. Podobnie jak w przypadku cytokin immunosupresyjnych okazało się jednak, że delecja genów kodujących CTLA-4 oraz PD-1 nie pozbawiało Tregs ich właściwości supresyjnych [34].

4.3.2.2. Immunosupresja w efekcie zjawiska trans-endocytozy

Inny mechanizm sugeruje udział CTLA-4 w zaburzeniu adhezji limfocytów T do komórek prezentujących antygen na drodze bezpośredniego wiązania CTLA-4 do APC i tym samym blokowania dostępu do nich limfocytom efektorowym [95].

Dotychczas sugerowana zasada działania CTLA-4 opierała się na wewnątrzkomórkowym przekazaniu sygnału supresji z udziałem domeny cytoplazmatycznej [98]. Niedawno przedstawiono model zewnątrzkomórkowy, w którym to cząsteczka CTLA-4 wykazuje zdolność do trans-endocytozy, czyli międzykomórkowego transferu swoich ligandów (CD80 i CD86) z powierzchni APC do wnętrza komórek, na których powierzchni się znajduje. Eksperymenty z udziałem CD86 wykazały, iż ligand ten jest internalizowany w całości i degradowany wewnątrz komórki CTLA-4+, nie pozostając na jej powierzchni, jak to się dzieje w zjawisku trogocytozy, charakterystycznym dla większości receptorów. Sama cząsteczka CTLA-4 nie ulega degradacji [99]. Jako że obie cząsteczki z rodziny B7 są ligandami zarówno dla CTLA-4 jak i CD28, ich deplecja przeprowadzana z udziałem CTLA-4 pozbawia komórki dendrytyczne ich właściwości aktywujących, uniemożliwiając CD28-zależną aktywację i różnicowanie naiwnych komórek T. Jest to proces zależny antygenowo [94].

4.4. Inne mechanizmy

W uzupełnieniu do omówionych powyżej, proponuje się obecnie też inne mechanizmy supresji przebiegające z udziałem Tregs. Na przykład, Tregs wykazują ekspresję ektoenzymów CD39 i CD73, które mogą rozszczepiać zewnątrzkomórkowy ATP, co generuje immunosupresyjną adenozyne blokującą funkcje efektorowych komórek T przez aktywację adenozyнового receptora 2A [100]. Tregs wykazują wysoki poziom cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP). W czasie kontaktu z efektorowymi komórkami T, Tregs mogą dostarczać cAMP do komórek efektorowych, co potencjalnie blokuje syntezę IL-2 i proliferację komórek T [101]. Brak IL-2 aktywuje proapoptotyczne białko Bim, co prowadzi efektorowe komórki T do apoptotycznej śmierci [50].

5. Kontrola odpowiedzi immunologicznej z udziałem cząsteczek powierzchniowych CD28, CTLA-4 oraz GITR

CD28 i CTLA-4 (ang. *cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4*) są receptorami swoistymi głównie dla limfocytów T. Podczas gdy cząsteczka CD28 jest obecna na powierzchni większości spoczynkowych i aktywowanych limfocytów T, obecność CTLA-4 ograniczona jest do komórek aktywowanych. Wyjątek stanowią Tregs, z jej konstytutywną ekspresją. Oba receptory wiążą się do cząsteczek z rodziny B7 - CD80 (B7-1) oraz CD86 (B7-2), znajdujących się na powierzchni APC [94]. Zasadnicza różnica dotyczy powinowactwa z jakim wiążą one swoje ligandy. W przypadku CTLA-4 jest ono 20-100-krotnie wyższe w porównaniu z cząsteczką CD28. Obie cząsteczki wiążą się częściej (ok. 10-krotnie) z ligandem CD80 [98]. Kontakt pomiędzy receptorami i ich ligandami odbywa się poprzez konserwatywny motyw aminokwasowy zlokalizowany w zewnątrzkomórkowej domenie CD28 i CTLA-4 [95].

Mimo podobieństw strukturalnych, cząsteczki te pełnią przeciwne funkcje. CD28 promuje (przy udziale stymulacji TCR) a CTLA-4 tłumii (na poziomie przekazywania sygnałów TCR oraz CD28) odpowiedź efektorowych limfocytów T [102]. Przeciwnie, CTLA-4 na limfocytach Treg jest niezbędna do pełnienia przez nie funkcji supresorowych *in vivo* i *in vitro*. Dowiodły tego eksperymenty z udziałem myszy ze znokautowanym genem *CTLA-4*, które ginęły przed osiągnięciem dojrzałości

na skutek wieloorganowego zapalenia. Knock-out genu nie upośledzał rozwoju ani żywotności komórek Treg, wpływał jedynie na ich funkcje [103]. Dodatkowo, brak tej cząsteczki na aktywowanych efektorowych limfocytach T, prowadzi do ich niekontrolowanej aktywności. Upośledzone Tregs nie są w stanie przeciwdziałać ich spontanicznej aktywacji i różnicowaniu w kierunku subpopulacji Th1 i Th2, odpowiedzialnych za występowanie chorób autoimmunologicznych i alergii. Ekspresja CTLA-4 na aktywowanych limfocytach T w sytuacji jej braku na powierzchni limfocytów T regulatorowych nie jest w stanie zapobiec patologicznej odpowiedzi immunologicznej [94].

Ekspresja CTLA-4 w Tregs jest kontrolowana przez czynnik transkrypcyjny FoxP3. Jej wysoki poziom przy jednoczesnym niskim poziomie ekspresji ligandów CD80 i CD86 na APC prowadzi do preferencyjnego wiązania CTLA-4 z ligandami, obniżając tym samym ich dostępność dla cząsteczki CD28. W efekcie limfocyty T efektorowe pozbawiane są sygnału kostymulacji. Powyższy mechanizm supresji jest zaledwie jednym z przebiegających z udziałem Tregs, których wybór zależy zapewne od mikrośrodowiska i fazy odpowiedzi immunologicznej, jednakże jego upośledzenie nie może być rekompensowane przez żaden inny, nawet wzmożony mechanizm. Dlatego też, CTLA-4 jest kluczowym narzędziem kontroli supresorowych funkcji Tregs w stanach autoimmunizacji, alergii oraz w przebiegu defektywnej odpowiedzi przeciwnowotworowej [104].

GITR (ang. *glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor - related protein*, TNFRSF18) jest cząsteczką z rodziny receptorów czynników martwicy nowotworu TNF-R (ang. *tumor necrosis factor receptor*). Ulega on wysokiej ekspresji na powierzchni komórek Treg oraz w niższym stopniu na powierzchni naiwnych komórek T, gdzie jego ekspresja wzrasta po aktywacji. GITR ligand (GITR-L) jest obecny na powierzchni wielu komórek, w tym śródbłónka, limfocytów B, makrofagów oraz komórek dendrytycznych pochodzenia szpikowego (BMDC, ang. *bone marrow-derived dendritic cells*) [105].

Rola sygnalizacji GITR-GITR-L jest bardzo kontrowersyjna. Początkowo uważano, że znosi ona przeprowadzaną przez Tregs supresję limfocytów efektorowych *in vitro*, przełamuje tolerancję immunologiczną względem autoantygenów oraz niektórych komórek nowotworowych *in vivo* [106,107]. Przeciwnie, najświeższe doniesienia dowodzą, że sygnalizacja poprzez GITR preferencyjnie aktywuje ekspansję komórek Treg *in vitro* i *in vivo* z zachowaniem ich funkcji supresorowych [105].

GITR funkcjonuje jako koaktywator zarówno limfocytów efektorowych, jak i regulatorowych gdy są one hodowane oddzielnie [108]. Jednakże w mieszaninie preferencyjnie aktywowane są Tregs. Zatem aktywacja GITR w Tef nie wystarcza do ich ucieczki spod supresji Tregs. Wyzwała natomiast produkcję, niezbędnej dla funkcji i przeżycia komórek regulatorowych, IL-2, prowadząc do wzrostu ich liczebności *in vivo*. Proliferyjące Tregs są funkcjonalnie kompetentne [109]. Należy jednak dodać, że GITR nie jest niezbędny przy produkcji IL-2, jako że myszy *GITR*^{-/-} cechują się normalną liczbą komórek Treg i brakiem objawów choroby autoimmunizacyjnej [105]. Niemniej jednak, oparty na stymulacji GITR przebieg odpowiedzi immunologicznej z preferencyjną aktywacją Tregs ma zdecydowanie bardziej charakter przeciw- niż prozapalny [110]. Posługując się modelem alergii wykazano, że sygnalizacja poprzez GITR-L w plazmocytoidalnych DC, jest powiązana z aktywacjąIDO-zależnej ścieżki blokowania odpowiedzi immunologicznej. Ponadto, GITR warunkuje oporność na apoptozę indukowaną przez TCR, co tłumaczy oporność Tregs na selekcję negatywną w grasicy [25].

6. Limfocyty T regulatorowe w mikrośrodowisku nowotworu

Liczne badania wiążą Tregs z indukcją tolerancji na nowotwór [70,71,76]. Ponieważ antygeny nowotworowe pochodzą od gospodarza i wiele antygenów związanych z nowotworem to także antygeny własne, komórki Treg rozpoznają nowotwór jako własny, co aktywnie promuje tolerancję. Badania na mysich nowotworach wykazały, że deplecja Tregs może znamienne nasilić odrzucanie guza i odwrotnie, transfer tych komórek może zablokować przeciwnowotworową odpowiedź z udziałem swoistych komórek CD8⁺ [111]. Tregs są też zdolne do inhibicji funkcji efektorowych komórek NK, które kontrolują wzrost guza *in vivo* [79]. Wykazano, że Tregs mogą wywoływać supresję zarówno odpowiedzi wrodzonej, jak i nabytej. Wysoki odsetek Tregs stwierdza się w krążeniu chorych na różne typy nowotworów [71] a zwiększone naciekanie guza nowotworowego przez Tregs jest związane z gorszym przebiegiem klinicznym nowotworów pochodzenia nabłonkowego, takich jak rak jajnika, sutka czy rak wątrobowokomórkowy [112].

6.1. Powstawanie antygenowo-specyficzných limfocytów T regulatorowych w mikrośrodowisku nowotworu

Istnieją trzy domniemane drogi powstawania antygenowo-specyficzných Tregs w mikrośrodowisku nowotworu. Pierwsza mówi, że naiwne limfocyty CD4+ stają się antygenowo-specyficznymi Tregs po kontakcie z antygenem w mikrośrodowisku nowotworu. Kolejna zakłada, że naiwne limfocyty CD4+ przekształcane są najpierw w antygenowo-specyficzne komórki CD4+ efektorowe (Th1 lub Th2) a następnie w antygenowo-specyficzne Tregs dzięki chronicznej, słabej stymulacji antygenami i obecności cytokin supresorowych w mikrośrodowisku nowotworu. Natomiast według ostatniej nTregs są aktywowane ligandami prezentowanymi przez komórki nowotworowe w efekcie czego stają się antygenowo-specyficznymi Tregs [47].

6.2. Aktywacja limfocytów T regulatorowych indukowana przez nowotwór

Istnieje wiele dowodów na to, że guz może wpływać na swoje środowisko komórkowe w celu ograniczenia odpowiedzi immunologicznej. Mechanizmy aktywacji Tregs indukowane przez guz są procesami wielostopniowymi i przebiegającymi z udziałem wielu sygnałów. Dużą liczbę CD4+CD25+Foxp3+ Tregs wykazano w krążeniu i w mikrośrodowisku guza chorych z rakiem płuc, sutka, jelita grubego, żołądka, wątroby, trzustki, jajnika, białaczką, chłoniakiem i czerniakiem [71]. O ile nacieki z komórek CD8+ są związane z korzystną prognozą, to wzrost stosunku Tregs do komórek CD8+ rokuje skrócenie czasu przeżycia chorych [113]. Sugeruje to, że zależność pomiędzy limfocytami regulatorowymi i efektorowymi w mikrośrodowisku nowotworu kształtuje balans między odpornością i tolerancją.

Wyniki wielu badań sugerują, że nowotwór może ograniczać odpowiedź immunologiczną przez promowanie rekrutacji, ekspansji i aktywacji Tregs [114]. Sygnał chemokinowy wydaje się odgrywać istotną rolę w tym procesie. W przypadku raka jajnika wykazano, że komórki nowotworowe i makrofagi w mikrośrodowisku guza produkują chemokinę CCL22, która przyciąga Tregs do masy guza. Tłumaczy to mechanizm, na drodze którego guz kreuje miejsce immunologicznie uprzywilejowane. Z kolei badania chorych z rakiem przewodu pokarmowego wykazały, że ekspresja chemokin CCL17 i CCL22 w obrębie guza koreluje ze wzrostem jego naciekania przez Tregs [115]. Wykazano, że Tregs są wybiórczo rekrutowane i aktywowane w obrębie

nacieków limfocytarnych otaczających pierwotne guzy sutka. Ich ocena *ex vivo* sugeruje, że te komórki CD4+CD25+Foxp3+ mogą być naturalnymi Tregs wykazującymi ekspresję receptora chemokinowego CCR4 i selektywnie przyciąganymi do mikrośrodowiska guza przez interakcje CCR4/CCL22. Komórki te mogą być wybiórczo aktywowane przez komórki dendrytyczne, prezentujące antygeny związane z guzem, które wywołują proliferację Tregs w środowisku guza, co pociąga za sobą blokowanie aktywacji komórek efektorowych, ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru układu odpornościowego i w końcu progresję nowotworu [116]. Tregs indukowane przez guz mogą powstawać zarówno z naturalnych Tregs, jak i z naiwnych komórek T [117].

Sygnaly płynące z interakcji TCR-antygen są determinantami grasiczej selekcji i różnicowania Tregs [118]. Kontrolują też ich obwodową aktywację i proliferację [119]. Stosowanie szczepionek antygenowych w leczeniu nowotworów jednocześnie wzbudza Tregs i komórki efektorowe. Jednak Tregs mogą mieć relatywnie wyższe powinowactwo do antygeny w porównaniu z komórkami efektorowymi [88]. W rezultacie ekspansja Tregs może być dominującym elementem odpowiedzi na szczepionki nowotworowe, tłumiąc ekspansję swoistych nowotworowo efektorowych komórek T i prowadząc do wzrostu tolerancji na antygeny nowotworowe [117].

Dodatkowo, sygnał cytokinowy reguluje rozwój, funkcje i homeostazę komórek Treg. IL-2 jest niezbędna dla ich ekspansji i aktywacji [120] a IL-4, IL-7 i IL-15 mogą wspierać te procesy [121,122]. Pozostaje niewyjaśnione, czy któraś z cytokin z rodziny IL-2 jest włączona w aktywację Tregs indukowaną przez nowotwór. Wiele guzów i związanych z guzem komórek układu odpornościowego produkuje IL-10 i TGF- β , które promują proliferację naturalnych Tregs a także konwersję nieregulatorowych komórek T w Tregs [70,71]. Podobnie jak inne komórki CD4+, Tregs są aktywowane w warunkach restrykcji MHC klasy II. Jednak większość guzów nie wywodzi się z komórek prezentujących antygen, nie wykazuje ekspresji antygenów MHC klasy II i nie może prezentować antygenów bezpośrednio komórkom Treg CD4+. W konsekwencji antygeny nowotworowe z większym prawdopodobieństwem są krzyżowo prezentowane przez APCs podczas indukowanej przez guz aktywacji Tregs. Wykazano, że komórki dendrytyczne wykazujące fenotyp niedojrzałych komórek mieloidalnych są rekrutowane do drenujących węzłów chłonnych w czasie progresji guza i że te DC selektywnie promują proliferację naturalnych Tregs na drodze zależnej

od TGF- β [123]. Plazmocytoidalne DC izolowane z drenujących guz węzłów chłonnych aktywują Tregs w procesach wykorzystujących MHC II, CTLA-4 i IDO [97].

7. Apoptoza limfocytów T regulatorowych – kontrola odpowiedzi immunologicznej

W początkowej fazie odpowiedzi immunologicznej stosunek limfocytów efektorowych do inhibitorowych jest wyższy, ponieważ limfocyty Tef proliferują szybciej niż limfocyty Treg. Jednak w miarę przebiegu odpowiedzi immunologicznej Tregs konsumują IL-2 i proliferują, jednocześnie powodując apoptozę zależnych od IL-2 komórek CD4+, uniemożliwiając im tym samym transformację w efektorowe komórki Th1, Th2 czy Th17 [50].

Wrażliwość limfocytów T regulatorowych na apoptozę jest zmienna w przebiegu odpowiedzi immunologicznej, zależna od stanu ich aktywacji oraz odwrotnie proporcjonalna do wrażliwości limfocytów T efektorowych. Podatność Tregs na apoptozę indukowaną CD95L (FasL) w przeciwieństwie do oporności wykazywanej przez spoczynkowe limfocyty T umożliwia zapoczątkowanie odpowiedzi immunologicznej. Z kolei podatność limfocytów efektorowych na apoptozę indukowaną przez aktywację (AICD) w przeciwieństwie do oporności wykazywanej przez limfocyty Treg umożliwia wygaszenie odpowiedzi immunologicznej. Śmierć pozostałych po wygaszeniu odpowiedzi immunologicznej Tregs odbywa się na drodze apoptozy wywołanej przez rozpuszczalny lub występujący na umierających komórkach efektorowych FasL, oraz obniżenia poziomu IL-2 produkowanej przez efektorowe limfocyty T [124].

Proces obniżania poziomu cytokin i indukcji apoptozy z udziałem Tregs może w różnym stopniu dotyczyć komórki docelowe. Zależy to od tego czy odpowiedź immunologiczna jest pro- czy przeciwzapalna oraz czy odpowiedź komórek efektorowych jest skierowana przeciw drobnoustrojom czy też antygenom własnym. Ponadto, na ich funkcje ma też wpływ faza odpowiedzi immunologicznej oraz obecność cytokin w środowisku [50].

8. Limfocyty T regulatorowe celem immunoterapii nowotworów

Immunosupresja z udziałem Tregs pozostaje jedną z głównych przeszkód dla efektywnej immunoterapii nowotworów. Szczepionki oparte na antygenach nowotworowych są efektywne w ograniczonym zakresie [125], ponieważ mogą aktywować Tregs i znacznie tłumić odpowiedź przeciwnowotworową [117]. Obecnie kilka sposobów postępowania mających na celu eliminację Tregs lub hamowanie ich funkcji daje wymierne, znajdujące odzwierciedlenie w badaniach przedklinicznych i klinicznych, korzyści. Denileukin diftitox (Ontak) jest rekombinowanym białkiem fuzyjnym składającym się z toksyny diphtheria i ludzkiej IL-2. Początkowo stosowano je w leczeniu skórnych chłoniaków T komórkowych charakteryzujących się wysoką ekspresją łańcucha α receptora dla IL-2 (CD25) w błonie komórkowej. Ontak wiąże się z receptorem dla IL-2, jest internalizowany na drodze endocytozy i blokuje syntezę białek, powodując śmierć komórki [81]. Badania kliniczne wykazały, że Ontak cechuje selektywna toksyczność wobec Tregs. Obiektywną odpowiedź kliniczną uzyskano w leczeniu chorych z przerzutami czerniaka, raka jajnika i nowotworów układu krwiotwórczego [81,126]. Przeciwciała monoklonalne przeciw CTLA-4 (ipilimumab i tremelimumab) są w trakcie badań fazy I i fazy II u chorych z przerzutami czerniaka [127]. Ponieważ CTLA-4 jest ekspozowana zarówno na efektorowych komórkach T, jak i na Tregs, dokładny mechanizm efektu blokady tej cząsteczki nie jest całkowicie poznany [125]. Obecne badania wykazują, że deplecja Tregs lub zablokowanie ich funkcji może nasilić odpowiedź przeciwnowotworową na modelu mysim i u chorych na raka. Jednak ten sposób postępowania może także wyidukować choroby o podłożu autoimmunizacyjnym [76,88]. Blokada CTLA-4 u chorych jest związana z zapaleniem jelita grubego, skóry i pęcherzyków płucnych [125]. Lepsze zrozumienie mechanizmów aktywacji Tregs indukowanej przez guzy i ich wpływu na funkcje tych komórek może stanowić główny kierunek rozwoju innowacyjnych podejść selektywnie przełamujących tolerowanie guza z udziałem Tregs, bez eliminacji tolerancji na własne antygeny. Tregs można aktywować na różnych poziomach i wykorzystując różne mechanizmy wzbudzania odpowiedzi immunologicznej [128]. Najnowsze badania wskazują kilka krytycznych punktów w zakresie indukowanej przez guz aktywacji Tregs, takich jak rekrutacja z udziałem chemokin, stymulowana przez APC proliferacja i indukowana przez cytokiny proliferacja i / lub różnicowanie. Ponadto, wykazano, że spoczynkowe Tregs nie wykazują ekspresji granzymu B. Jest on indukowany w Tregs związanych

z nowotworem. W przeciwieństwie do myszy *FOXP3*^{-/-}, *TGF- β* ^{-/-} lub *CTLA-4*^{-/-}, które zawsze ulegają chorobom autoimmunizacyjnym, myszy pozbawione obydwu kopii genu kodującego granzym B (*GzmB*^{-/-}) wykazują znamienne nasiloną zdolność do odrzucania nowotworów przeszczepialnych [85]. Wydaje się więc, że selektywne blokowanie Tregs związanych z nowotworem, np. na drodze blokowania granzymu B, może być skuteczniejsze od globalnej delecji tych komórek, poprawiając odporność przeciwnowotworową, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności Tregs do zapobiegania procesom autoimmunizacyjnym.

CELE PRACY

W chorobach nowotworowych stwierdza się wzrost aktywności i odsetka limfocytów T regulatorowych. Kluczową kwestią jest określenie, czy Tregs związane z nowotworem tłumią odpowiedź przeciwnowotworową przy pomocy mechanizmów innych niż te, które przeciwdziałają autoimmunizacji. Wiedza ta mogłaby doprowadzić do wprowadzenia strategii leczenia opartych na swoistych dla nowotworu funkcjach komórek T regulatorowych.

Celem pracy było wykazanie wzrostu liczebności komórek T regulatorowych w mikrośrodkowisku zaawansowanej choroby nowotworowej, manifestacją której jest wysięk opłucnowy, z elementami ich charakterystyki czynnościowej. Cel ten realizowano poprzez:

1. Ocena odsetka limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+ w mikrośrodkowisku nowotworowych wysięków opłucnowych w porównaniu z wysiękami nienowotworowymi
2. Określenie stężenia TGF- β w mikrośrodkowisku nowotworowych wysięków opłucnowych w porównaniu z wysiękami nienowotworowymi
3. Ocena zależności pomiędzy odsetkiem limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+ a stężeniem TGF- β w mikrośrodkowisku nowotworowych i nienowotworowych wysięków opłucnowych
4. Ocena względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* wśród wyizolowanych komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych i nienowotworowych wysięków opłucnowych
5. Ocena względnego poziomu transkryptu genów *CTLA-4*, *CD28* oraz *GITR* wśród wyizolowanych komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych i nienowotworowych wysięków opłucnowych

6. Ocenę zależności pomiędzy względnym poziomem transkryptu badanych genów (*FOXP3*, *CTLA-4*, *CD28* oraz *GITR*) w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych i nienowotworowych wyсіęków opłucnowych.

MATERIAŁY I METODY

1. Wysięki opłucnowe

Przebadano materiał pochodzący od 111 chorych z wysiękami opłucnowymi. Chorzy ci byli hospitalizowani na Oddziale Onkologii Klinicznej z Pododdziałem Diennej Chemioterapii Wielkopolskiego Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii oraz w Klinice Pulmonologii, Alergologii i Onkologii Pulmonologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Byli to chorzy z IV stopniem zaawansowania choroby nowotworowej (dane zaczerpnięte z historii chorób pacjentów). Oceny stopnia zaawansowania choroby dokonano na podstawie VII edycji klasyfikacji TNM dla raka płuca, wydanej pod auspicjami Międzynarodowego Towarzystwa Badań nad Rakiem Płuca (IASLC, ang. *International Association for the Study of Lung Cancer*). Określenie stopnia zaawansowania raka płuca obejmuje stan guza pierwotnego (cecha T), regionalnych węzłów chłonnych (cecha N) i narządów, w których mogą występować przerzuty (cecha M). Łączna ocena cech TNM pozwala na określenie stopnia zaawansowania raka płuca [129]. Materiał został pozyskany drogą torakocentezy i poddany badaniom cytologicznym. W 78 wysiękach metodą cytometrii przepływowej oceniono odsetek komórek T regulatorowych oraz stężenie cytokiny TGF- β 1, w 33 przeprowadzono badania molekularne. Materiał biologiczny podzielono na 3 grupy: wysięki opłucnowe pochodzące od pacjentów z chorobą nowotworową zawierające komórki nowotworowe (48), wysięki pochodzące od pacjentów z chorobą nowotworową, u których w badaniu cytologicznym nie stwierdzono obecności komórek nowotworowych (23) i nienowotworowe wysięki opłucnowe (40). 33 wysięki przeznaczone do oceny molekularnej podzielono wyłącznie na 2 grupy (nowotworową zawierającą komórki nowotworowe i nienowotworową). Wysięki nienowotworowe pochodziły od chorych z wysiękowym zapaleniem opłucnej, niewydolnością krążenia i gruźlicą płuc. Żaden z pacjentów z nowotworowym wysiękiem opłucnowym nie był poddany terapii przeciwnowotworowej. Szczegółowe dane dotyczące grup przebadanych wysięków przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Zestawienie przebadanych wysięków.

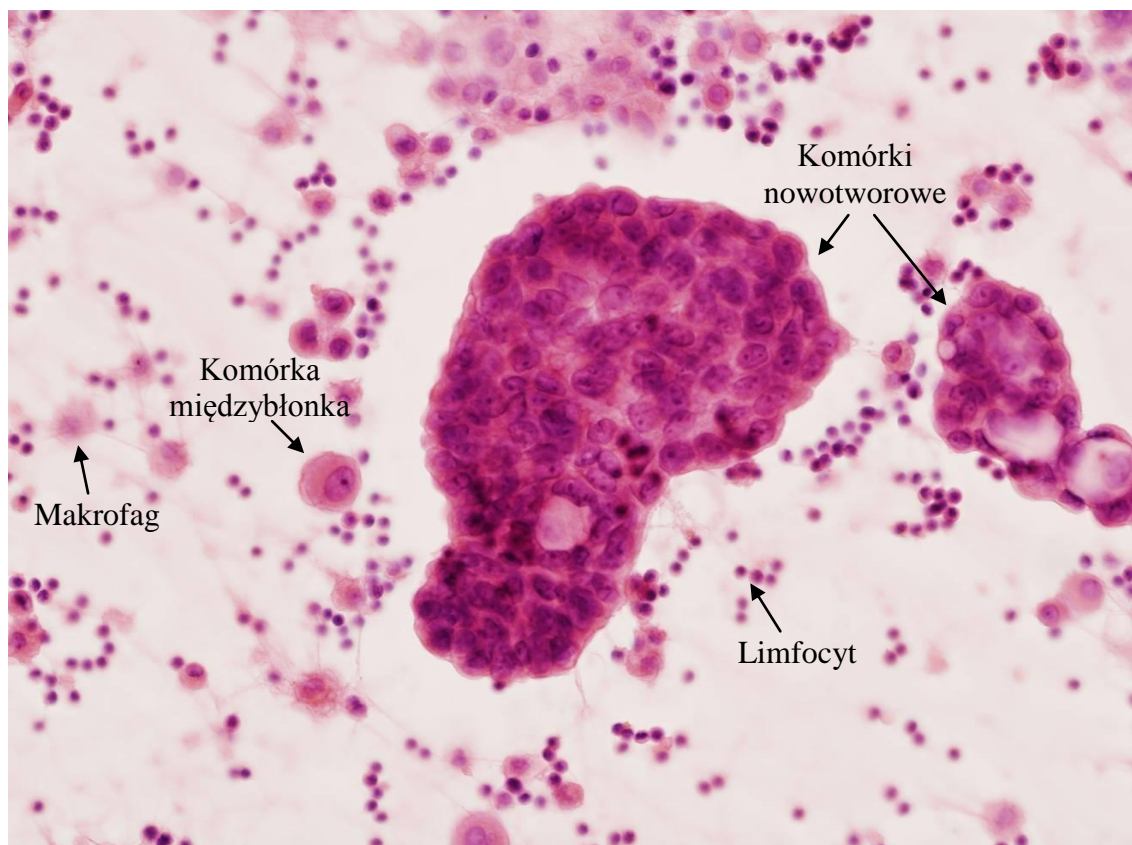
Grupa wysięków	Liczba przypadków	
	Badania immunofenotypowe, stężenie TGF- β 1	Badania molekularne
I. Wysięki nowotworowe z komórkami nowotworowymi	29	19
Rak gruczołowy oskrzela	29	14
Rak drobnokomórkowy oskrzela		4
Międzybłoniak		1
II. Wysięki nowotworowe bez komórek nowotworowych	23	
Rak gruczołowy oskrzela	23	
III. Wysięki nienowotworowe	26	14

1.1. Przygotowanie osadu komórek z wysięków opłucnowych

Płyny wysiękowe były pobierane do sterylnych probówek 50 ml zawierających 2000 IU heparyny i przesączone przez gazę jałową w celu uzyskania klarownego płynu. Następnie były wirowane przez 10 min przy 500 x g w temp. pokojowej. Supernatanty były następnie mrożone i przechowywane w temp. -70°C do czasu oceny stężenia TGF- β 1. Natomiast osady komórkowe były przekazywane do oceny cytologicznej i wykorzystywane do analizy cytometrycznej lub molekularnej.

1.2. Badania cytologiczne

Kropla uzyskanego po zwirowaniu płynów osadu była umieszczana na szkiełku podstawowym. Po wykonaniu rozmazu materiał był utrwalany preparatem Cytifix[®] (Samko, Polska), a następnie po uwodnieniu barwione hematoksyliną i eozyną. Preparaty były oceniane pod kątem obecności lub braku komórek nowotworowych (ryc. 4). We wszystkich przypadkach wyniki oceny cytologicznej zostały potwierdzone wynikami badań histopatologicznych materiału uzyskanego drogą bronchoskopii i danymi klinicznymi.



Ryc. 4. Obraz cytologiczny jednego z badanych nowotworowych wysięków opłucnowych.

2. Badania cytometryczne

2.1. Ocena odsetka komórek T regulatorowych w wysiękach opłucnowych

Ocenę odsetka komórek T regulatorowych w obrębie limfocytów wysięków opłucnowych przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem gotowego zestawu Human Treg Flow™ Kit (FOXP3 Alexa Fluor® 488 / CD4 PE-Cy5 / CD25 PE, BioLegend®, USA). Charakterystykę użytych przeciwciał oraz szczegółowy skład zestawu przedstawia tab. 2 i 3. Odczynniki użyte do oznaczeń spoza zestawu zostały przedstawione w tab. 4.

Zgodnie z zaleceniami producenta na dno probówek cytometrycznych podawano 20 μ l mieszaniny przeciwciał przeciw CD4 PE-Cy5 oraz przeciw CD25 PE (anti-human CD4 PE-Cy5 / CD25 PE Cocktail, BioLegend®, USA). Następnie dodawano $0,5-1 \times 10^6$ komórek na probówkę, mieszano i inkubowano przez 20 min w temp. pokojowej chroniąc przed dostępem światła. Po upływie tego czasu dodawano 1 ml buforu

płuczącego (Cell Staining Buffer, BioLegend®, USA), wirowano przez 5 min przy 250 x g a następnie usuwano supernatant. W następnym etapie komórki utrwalano i permeabilizowano. W tym celu przygotowywano rozcieńczenie buforu utrwalającego i permeabilizującego dostępnego w zestawie (4x FOXP3 Fix/Perm buffer, BioLegend®, USA), mieszając 1 część wyjściowego buforu (4x) z 3 częściami PBS. Do powstałego w wyniku wirowania osadu dodawano 1 ml otrzymanego roztworu. Tak przygotowany materiał mieszano i inkubowano przez 20 min w temp. pokojowej chroniąc przed dostępem światła. Po zakończeniu inkubacji komórki wirowano przez 5 min przy 250 x g a następnie usuwano bufor utrwalający i permeabilizujący. Osad płukano w buforze płuczącym poprzez 5-minutowe wirowanie przy 250 x g a następnie supernatant odrzucano. Przygotowywano rozcieńczenie buforu permeabilizującego błonę komórkową (10x FOXP3 Perm buffer, BioLegend®, USA), mieszając 1 część wyjściowego buforu (10x) z 9 częściami PBS. Tak przygotowanym roztworem jednokrotnie płukano komórki, wirując je przez 5 min przy 250 x g a następnie usuwano supernatant. Osad komórkowy zawieszano w 1 ml powyższego buforu permeabilizującego błonę komórkową, mieszano i inkubowano w temp. pokojowej chroniąc przed dostępem światła. Po upływie 15 min mieszaninę wirowano, usuwano supernatant a pozostały osad zawieszano w 100 µl buforu permeabilizującego błonę komórkową. Po utrwaleniu komórek i permeabilizacji błon komórkowych przystępowano do barwienia cytoplazmatycznego wewnątrzkomórkowego czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Do próbek zawierających wyznakowane przeciwciałami przeciw CD4 i przeciw CD25 komórki dodawano 5 µl przeciwciała przeciw FoxP3 (Alexa Fluor® 488 anti-human FOXP3, BioLegend®, USA) lub odpowiednio 5 µl mysiej kontroli izotopowej IgG1, κ (Alexa Fluor® 488 Mouse IgG1, κ isotype control BioLegend®, USA), w celu określenia nieswoistej fluorescencji tła stosowanych przeciwciał. Po dokładnym zmieszaniu osadu komórkowego z przeciwciałami materiał inkubowano przez 30 min w temp. pokojowej chroniąc przed dostępem światła. Po upływie tego czasu dwukrotnie płukano komórki, każdorazowo dodając do nich po 1 ml buforu płuczącego i wirując przez 5 min przy 250 x g w temp. pokojowej. Na koniec bufor usuwano a osad zawieszano w 0,5 ml buforu płuczącego. Akwizycję 20000 komórek przeprowadzano przy pomocy aparatu FACSCanto (BD Biosciences, USA).

Tab. 2. Charakterystyka przeciwciał użytych do oceny cytometrycznej komórek T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+.

Symbol przeciwciała	Fluorochrom	Klon	Źródło
CD4, CD25 Cocktail	PE-Cy5/ PE	RPA-T4/BC96	BioLegend®, USA
FoxP3	Alexa Fluor® 488	259D	BioLegend®, USA
Mouse IgG1, κ isotype control	Alexa Fluor® 488	MOPC-21	BioLegend®, USA

Tab. 3. Szczegółowy skład zestawu Human Treg Flow™ Kit (FOXP3 Alexa Fluor® 488 / CD4 PE-Cy5 / CD25 PE), (320401, BioLegend®, USA).

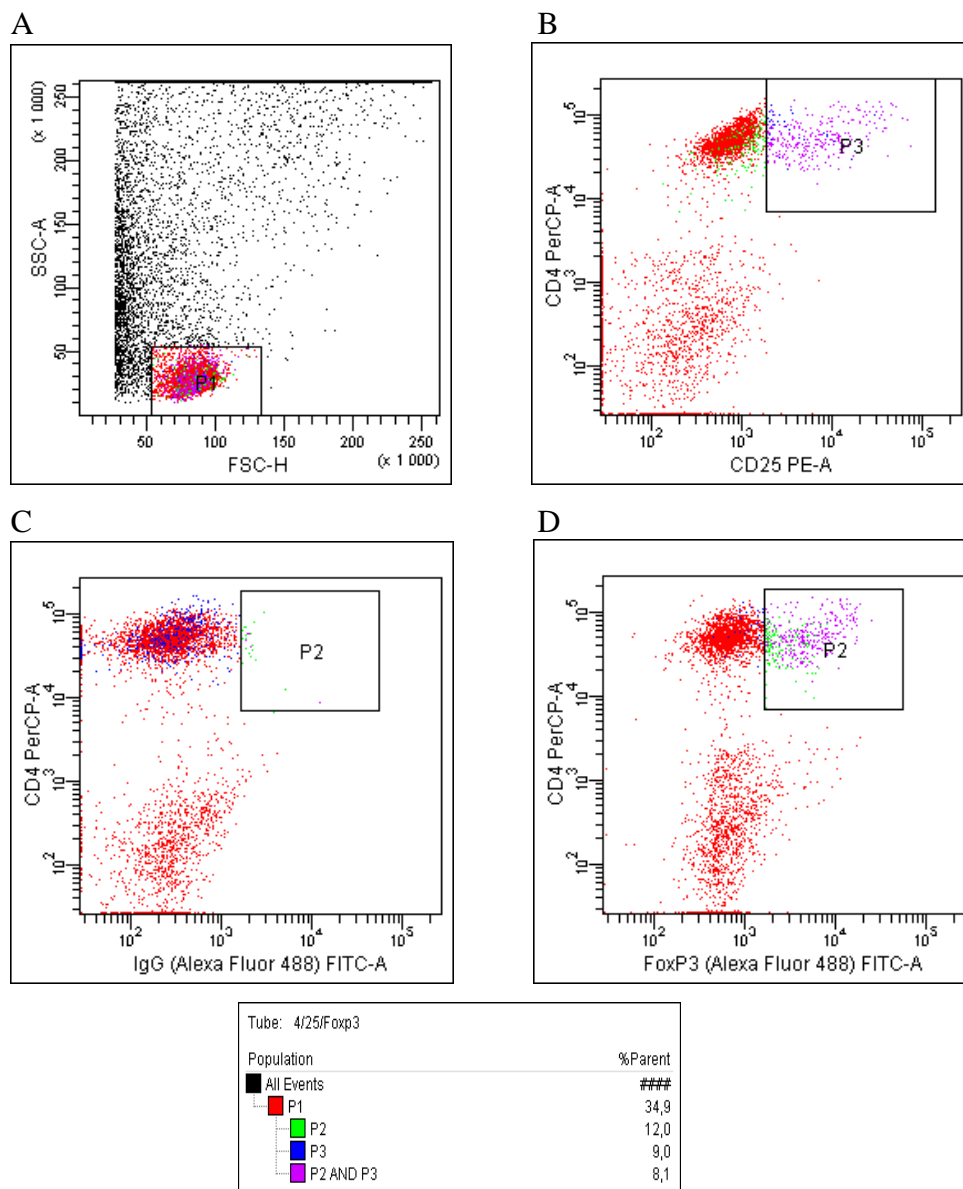
Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
anti-human CD4 PE-Cy5/CD25 PE Cocktail	78930	BioLegend®, USA
Alexa Fluor® 488 anti-human FOXP3	79467	BioLegend®, USA
Alexa Fluor® 488 Mouse IgG1, κ isotype control	79486	BioLegend®, USA
FOXP3 Fix/Perm buffer and FOXP3 Perm buffer	421403	BioLegend®, USA

Tab. 4. Odczynniki nie zawarte w zestawie Human Treg Flow™ Kit (FOXP3 Alexa Fluor® 488 / CD4 PE-Cy5 / CD25 PE, BioLegend®, USA).

Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
Cell Staining Buffer	420201	BioLegend®, USA
Premixed PBS Buffer, 10x	11666789001	Roche Diagnostics, Niemcy

2.2. Analiza danych

Do analizy danych wykorzystywano oprogramowanie FACSDiva (BD Biosciences, USA). Limfocyty identyfikowano w układzie FSC/SSC oraz w oparciu o ekspresję CD45 i brak ekspresji CD14 (ryc. 1). Odsetek komórek T regulatorowych oceniano na podstawie ekspresji CD4/CD25/FoxP3. Ryc. 5 przedstawia przykład oceny odsetka komórek T regulatorowych w jednym z badanych wysięków opłucnowych.



Ryc. 5. Przykład oceny odsetka komórek T regulatorowych wśród limfocytów wysięku opłucnowego; A – bramka na limfocytach (P1), B – bramka na limfocytach CD4+CD25+ (P3), C – kontrola izotypowa, D – odsetek komórek T regulatorowych wykazujących ekspresją FoxP3 w oparciu o iloczyn logiczny (P2 and P3).

3. Pomiar stężenia TGF- β 1 w wysiękach opłucnowych

Stężenie TGF- β 1 w wysiękach opłucnowych pozyskanych od 78 pacjentów, u których została przeprowadzona analiza cytometryczna, określono w dwóch powtórzeniach przy użyciu zestawu do oceny immunoenzymatycznej ELISA Quantikine[®] Human TGF- β 1 (R&D Systems[®], USA). Szczegółowy skład zestawu oraz odczynniki użyte do oznaczeń spoza zestawu przedstawiono w tab. 5 i 6.

3.1. Oznaczenie stężenia TGF- β 1

Procedurę rozpoczynano od aktywacji letentnej formy TGF- β 1, wydzielanej w warunkach fizjologicznych w formie kompleksów LAP i LTBP do immunoreaktywnej. W tym celu do 40 μ l wysięku opłucnowego dodawano 20 μ l 1N HCl, mieszano i inkubowano przez 10 min w temp. pokojowej w celu obniżenia pH środowiska. Próby neutralizowano poprzez dodanie 20 μ l 1,2 N NaOH w 0,5 M HEPES. Aktywowane próby rozcieńczano 20-krotnie dodając do 10 μ l aktywowanej próby 190 μ l kalibracyjnego buforu rozcieńczającego (1x Calibrator Diluent RD5-53, R&D Systems[®], USA).

Do każdej z testowanych studzienek płytki mikrotitracyjnej podawano 50 μ l buforu rozcieńczającego próby (Assay Diluent RD1-73, R&D Systems[®], USA). Następnie do pierwszych ośmiu dołków dodawano 50 μ l rozcieńczonych (1x Calibrator Diluent RD5-53, R&D Systems[®], USA) standardów poczynając od najwyższego stężenia (TGF- β 1 Standard, R&D Systems[®], USA). Do pozostałych dołków dodawano 50 μ l kontroli i aktywowanych, rozcieńczonych wysięków opłucnowych. Kontrolę negatywną reakcji stanowił czysty bufor rozcieńczający próby. Zawartość dołków płytki delikatnie mieszano, przykrywano załączoną w zestawie folią i inkubowano przez 2 godz. w temp. pokojowej. Po upływie tego czasu płytkę 4-krotnie płukano, każdorazowo dodając po 0,4 ml buforu płuczającego (1x Wash Buffer, R&D Systems[®], USA). Do całkowicie opróżnionych dołków dodawano po 100 μ l poliklonalnych przeciwciał przeciw TGF- β 1 połączonych z peroksydazą chrzanową (TGF- β 1 Conjugate, R&D Systems[®], USA) na czas kolejnych 2 godz. w temp. pokojowej. Następnie powtarzano procedurę płukania i dodawano po 100 μ l roztworu substratu (Color Reagent A + B, R&D Systems[®], USA). Inkubację przeprowadzano chroniąc

próby przed dostępem światła przez 30 min w temp. pokojowej. Następnie blokowano reakcję enzymatyczną dodając po 100 μ l roztworu stopującego reakcję (Stop Solution, R&D Systems[®], USA). Zawartość dołków płytki mieszano i określano wartość gęstości optycznej w każdej studzience w ciągu 30 min od zatrzymania procesu za pomocą czytnika ELISA Multiskan Bichromatic (Labsystems, Finlandia). Pomiar przebiegał przy długości fali 450 nm i długości fali referencyjnej 540 nm. Wartości stężeń dla poszczególnych prób określano na podstawie krzywych standardowych.

Tab. 5. Szczegółowy skład zestawu Quantikine[®] Human TGF- β 1 (DB100B, R&D Systems[®], USA).

Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
TGF- β 1 Microplate	891124	R&D Systems [®] , USA
TGF- β 1 Conjugate	893003	R&D Systems [®] , USA
TGF- β 1 Standard	891126	R&D Systems [®] , USA
Assay Diluent RD1-21 for cell culture supernates samples	895215	R&D Systems [®] , USA
Assay Diluent RD1-73 for serum/plasma samples	895541	R&D Systems [®] , USA
Calibrator Diluent RD5-53 Concentrate 4x	895587	R&D Systems [®] , USA
Wash Buffer Concentrate 25x	895024	R&D Systems [®] , USA
Color Reagent A	895000	R&D Systems [®] , USA
Color Reagent B	895001	R&D Systems [®] , USA
Stop Solution	895174	R&D Systems [®] , USA
Plate Covers	-	R&D Systems [®] , USA

Tab. 6. Odczynniki niezawarte w zestawie Quantikine[®] Human TGF- β 1 (R&D Systems[®], USA).

Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
Kwas chlorowodorowy (HCl)	71763	Fluka Analytical
Wodorotlenek sodu (NaOH)	35274	Fluka Analytical
HEPES	H3375-25G	Sigma-Aldrich

4. Izolacja komórek CD4+CD25+ z wysięków opłucnowych

Komórki CD4+CD25+ wyizolowano z wysięków opłucnowych pochodzących od 33 pacjentów (tab. 1) z zastosowaniem zestawu do izolacji komórek na złożach magnetycznych - CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotec, Niemcy). Szczegółowy skład zestawu oraz spis odczynników użytych do izolacji spoza zestawu zawiera tab. 7 i 8. Izolacja komórek CD4+CD25+ była przeprowadzana w dwóch etapach. Pierwszy obejmował uzyskanie frakcji komórek CD4+, która następnie była zawężana do subpopulacji komórek CD4+CD25+. Efektem końcowym izolacji było uzyskanie każdorazowo od pacjentów zarówno komórek badanych CD4+CD25+ jak również komórek CD4+CD25-, stanowiących grupę kontrolną w dalszych badaniach.

4.1. Selekcja negatywna – uzyskanie frakcji komórek CD4+

4.1.1. Magnetyczne znakowanie komórek CD4-

Określano liczbę komórek znajdujących się w osadzie uzyskanym w wyniku wirowania płynu wysiękowego przy prędkości 300 x g przez 5 min w temp. pokojowej. Na każde 10^7 komórek dodawano 90 μ l buforu płuczającego (Running Buffer, Miltenyi Biotec, Niemcy) i 10 μ l mieszaniny biotynylowanych przeciwciał (Biotin-Antibody Cocktail, Miltenyi Biotec, Niemcy). Zawartość probówek mieszano i inkubowano przez 10 min w temp. 4-8°C. Po tym czasie na każde 10^7 komórek dodawano 20 μ l przeciwciał przeciw biotynie skoniugowanych z kulkami magnetycznymi (Anti-Biotin MicroBeads, Miltenyi Biotec, Niemcy) i ponownie inkubowano przez 15 min w temp. 4-8°C. Komórki następnie płukano dodając 1-2 ml buforu płuczającego i wirując przy prędkości 300 x g przez 10 min w temp. 4-8°C. Utworzony w wyniku wirowania supernatant odrzucano. Każde 10^8 komórek z uzyskanego osadu zawieszano w 0,5 ml buforu płuczającego i wykorzystywano do separacji magnetycznej.

4.1.2. Separacja magnetyczna – eliminacja komórek CD4-

W celu eliminacji komórek CD4- kolumnę typu LD (LD Column, Miltenyi Biotec, Niemcy) umieszczano w polu magnetycznym separatora (MACS Separator, Miltenyi Biotec, Niemcy) i przemywano 2 ml buforu płuczącego. Na tak przygotowaną kolumnę наносono mieszaninę komórek związanych z przeciwciałami. Komórki nie posiadające cząsteczki CD4 były zatrzymywane na kolumnie podczas gdy niezwiązane z przeciwciałami komórki CD4+ przepływały przez nią swobodnie. Pustą kolumnę dwukrotnie płukano 1 ml buforu płuczącego a całość eluentu zbierano.

4.2. Selekcja pozytywna – uzyskanie frakcji komórek CD4+CD25+

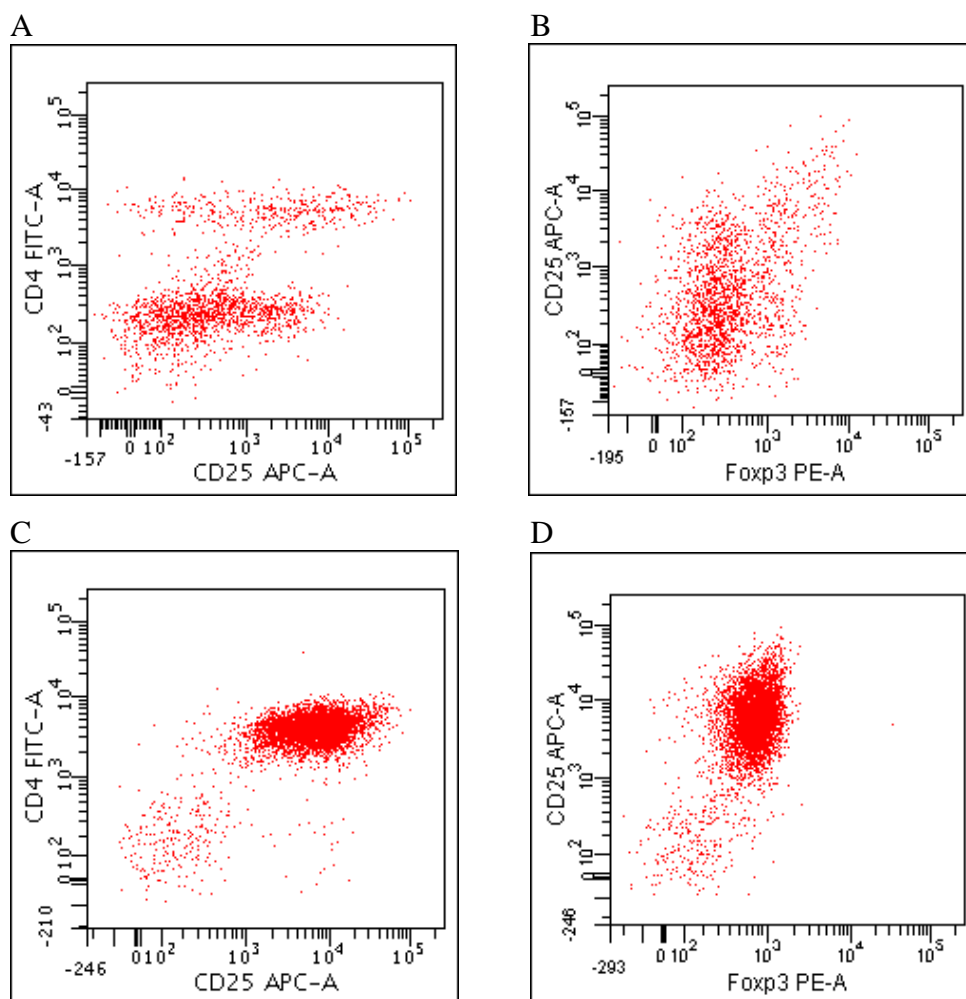
4.2.1. Magnetyczne znakowanie komórek CD4+CD25+

Mieszaninę uzyskanych, niewyznakowanych komórek CD4+ wirowano przy prędkości 300 x g przez 10 min a następnie usuwano supernatant. Każde 10^7 komórek z uzyskanego osadu zawieszano w 90 μ l buforu płuczącego i dodawano 10 μ l przeciwciał przeciw CD25 skoniugowanych z kulkami magnetycznymi (CD25 Microbeads, Miltenyi Biotec, Niemcy). Próbkę mieszano i inkubowano w temp. 4-8°C. Po upływie 15 min komórki płukano 10-20-krotną objętością buforu płuczącego i wirowano przy prędkości 300 x g przez 10 min. Następnie usuwano supernatant a każde 10^8 komórek zawieszano w 0,5 ml buforu płuczącego.

4.2.2. Separacja magnetyczna – uzyskanie frakcji komórek CD4+CD25+

W celu pozyskania komórek CD4+CD25+ kolumnę typu MS (MS Column, Miltenyi Biotec, Niemcy) umieszczano w polu magnetycznym separatora i przemywano 0,5 ml buforu płuczącego. Na tak przygotowaną kolumnę наносono mieszaninę komórek związanych z przeciwciałami komórek. Komórki posiadające oprócz cząsteczki CD4 również wyznakowaną magnetycznie cząsteczkę CD25 były zatrzymywane na kolumnie, podczas gdy komórki CD4+CD25- przepływały przez nią swobodnie. Pustą kolumnę płukano trzykrotnie 0,5 ml buforu płuczącego i całość eluentu zbierano. Znajdujące się w nim komórki CD4+CD25- stanowiły grupę kontrolną w dalszych badaniach. Aby uwolnić komórki CD4+CD25+ związane z

kolumną, usuwano ją z separatora i podawano pod ciśnieniem, za pomocą załączonego tłoczka, 1 ml buforu przemywającego. W celu zwiększenia czystości frakcji komórek CD4+CD25+ powtarzano procedurę separacji magnetycznej z użyciem nowej kolumny MS. Ryc. 6 przedstawia cytometryczną ocenę produktu izolacji komórek CD4+CD25+.



Ryc. 6. Ocena produktu izolacji komórek CD4+CD25+. A, B – *ex vivo*; C, D – po izolacji.

Tab. 7. Szczegółowy skład zestawu CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human (130-091-301, Miltenyi Biotec, Niemcy).

Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
1ml CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail, human	120-001-464	Miltenyi Biotec, Niemcy
2ml Anti-Biotin MicroBeads	120-000-900	Miltenyi Biotec, Niemcy
1ml CD25 MicroBeads	120-001-596	Miltenyi Biotec, Niemcy

Tab. 8. Odczynniki niezawarte w zestawie CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotec, Niemcy).

Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
LD Columns	130-042-901	Miltenyi Biotec, Niemcy
MS Columns	130-042-201	Miltenyi Biotec, Niemcy
Running Buffer	130-091-221	Miltenyi Biotec, Niemcy
MidiMACS Separator	130-042-302	Miltenyi Biotec, Niemcy
MiniMACS Separator	130-042-102	Miltenyi Biotec, Niemcy
MultiStand	130-042-303	Miltenyi Biotec, Niemcy

5. Pomiar względnego poziomu transkryptu wybranych genów limfocytów CD4+CD25+ z wysięków opłucnowych

Badania molekularne przeprowadzono na limfocytach CD4+CD25+ wyizolowanych z wysięków pochodzących od 33 pacjentów (tab. 1). W tym celu izolowano RNA, które przepisywano na matrycę cDNA. Następnie przeprowadzono ilościową ocenę ekspresji genów z zastosowaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy z pomiarem ekspresji genów w czasie rzeczywistym – Real-Time PCR (qRT-PCR).

5.1. Izolacja całkowitego RNA

Całkowity komórkowy RNA izolowano z zastosowaniem zestawu TRIzol[®] Plus RNA Purification System (Life Technologies, USA). Cała procedura bazowała na zmodyfikowanej metodzie Chomczyńskiego – Sacchi [130]. Skład zestawu oraz odczynniki wykorzystane do izolacji całkowitego RNA niezawarte w zestawie przedstawia tab. 9 i 10.

5.1.1. Separacja fazowa

Osad komórkowy nie przekraczający $5-10 \times 10^6$ komórek poddawano lizie w 1 ml mieszaniny fenolu i izotiocyanianu guanidyny (TRIzol[®] Reagent, Life Technologies, USA). Mieszaninę inkubowano w temp. pokojowej przez 5 min, w celu całkowitego

rozbicia jądrowych kompleksów białkowych. Następnie do probówek dodawano 0,2 ml chloroformu (POCH, Polska) i wytrząsano przez 15 s. Mieszaninę inkubowano przez 2-3 min w temp. pokojowej. Po upływie tego czasu próby wirowano przy prędkości 12000 x g przez 15 min w temp. 4°C. W wyniku wirowania następował rozdział prób na dolną, czerwoną fenolowo-chloroformową fazę zawierającą białka i struktury subkomórkowe, interfazę zawierającą DNA oraz górną, bezbarwną wodną fazę zawierającą RNA. Jej objętość wynosiła średnio 0,6 ml. Fazę wodną przenoszono do nowej probówki i dodawano taką samą objętość 70% etanolu (POCH, Polska), tak aby uzyskać końcowe stężenie wynoszące 35%. Próby dokładnie mieszano.

5.1.2. Uzyskanie oczyszczonego RNA na kolumnach

Maksymalnie 0,7 ml próby przenoszono do kolumny (Spin Cartridge, Life Technologies, USA) umiejscowionej w probówce zbiorczej (Collection Tube, Life Technologies, USA) i wirowano przy prędkości 12000 x g przez 15 s w temp. pokojowej. Przesącz zlewano a kolumnę umieszczano ponownie w tej samej probówce. Powyższe czynności powtarzano aż do przesączenia całości próby. Następnie dodawano 0,7 ml buforu płuczącego I (Wash Buffer I, Life Technologies, USA) i wirowano przy prędkości 12000 x g przez 15 s w temp. pokojowej. Przesącz zlewano a kolumnę umieszczano w nowej probówce. Następnie dodawano 0,5 ml buforu płuczącego II z dodatkiem etanolu (Wash Buffer II, Life Technologies, USA) i wirowano przy prędkości 12000 x g przez 15 s w temp. pokojowej. Przesącz zlewano a kolumnę przenoszono do tej samej probówki w celu powtórzenia procedury. Pustą probówkę wirowano przez 1 min w temp. pokojowej w celu wysuszenia membrany ze związanym RNA. Kolumnę umieszczano w docelowej probówce zbiorczej (Recovery Tube, Life Technologies, USA). W celu wymycia związanego z kolumną RNA na jej środek podawano 30 µl wolnej od RNaz wody, czekano 1 min a następnie wirowano przez 2 min przy prędkości ≥ 12000 x g w temp. pokojowej. Usuwano kolumnę a znajdujące się w probówce oczyszczone całkowite RNA przechowywano do czasu dalszych analiz w zamrażarce niskotemperaturowej (-70°C).

Tab. 9. Skład zestawu TRIzol[®] Plus RNA Purification System (12183555, Life Technologies, USA).

Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
TRIzol [®] Reagent	15596-026	Life Technologies, USA
Wash Buffer I	466002	Life Technologies, USA
Wash Buffer II	466003	Life Technologies, USA
RNase-Free Water	466004	Life Technologies, USA
Spin Cartridges (with collection tubes)	466005	Life Technologies, USA
Collection Tubes	460627	Life Technologies, USA
Recovery Tubes	466007	Life Technologies, USA

Tab. 10. Odczynniki niezawarte w zestawie TRIzol[®] Plus RNA Purification System (Life Technologies, USA).

Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
Alkohol etylowy EtOH	396480427	POCH, Polska
Chloroform	234430427	POCH, Polska

5.2. Pomiar stężenia uzyskanego całkowitego RNA

Pomiar stężenia RNA oznaczano przy długości fali $\lambda = 260$ nm z zastosowaniem spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific NanoDrop Products, USA), używając każdorazowo do analizy 2 μ l próby badanej. Aparat kalibrowano zastosowanym rozpuszczalnikiem (RNase-Free Water, Life Technologies, USA). Uzyskany wynik odczytywano stosując program komputerowy ND-1000 v3.5.2 (Coleman Technologies Inc., USA).

5.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Całkowite wyizolowane RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji, polegającej na uzyskaniu pojedynczo-niciowej matrycy cDNA na bazie RNA z udziałem enzymu odwrotnej transkryptazy (polimerazy DNA zależnej od RNA). W tym celu używano zestawu Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche

Diagnostics, Niemcy). Jego skład przedstawia tab. 11. Próbkę zamrożonego całkowitego RNA rozmrażano, wirowano oraz umieszczano na czas składania reakcji na lodzie. W sterylnych, wolnych od nukleaz próbkach przygotowywano mieszaninę matrycy ze starterami, składającą się z 1 μl oligo(dT) (Anchored-oligo(dT)₁₈ Primer, 50 pmol/ μl , Roche Diagnostics, Niemcy) oraz objętości całkowitego RNA odpowiadającej 1 μg na próbę. Całość mieszaniny uzupełniano wodą do objętości 13 μl (Water PCR-grade, Roche Diagnostics, Niemcy). Mieszaninę podgrzewano przez 10 min w temp. 65°C w termocyklerze z ogrzewaną pokrywą (Mastercycler EP Gradient, Eppendorf) w celu denaturacji II-rzędowej struktury RNA. Po upływie czasu próby umieszczano na lodzie a następnie dodawano następujące składniki mieszaniny reakcyjnej: 4 μl buforu (Transcriptor RT Reaction Buffer, 5x conc., Roche Diagnostics, Niemcy), 0,5 μl inhibitora RNaz (Protector RNase Inhibitor, 40 U/ μl , Roche Diagnostics, Niemcy), 2 μl dNTP (Deoxynucleotide Mix, 10 mM, Roche Diagnostics, Niemcy) oraz 0,5 μl odwrotnej transkryptazy (Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/ μl , Roche Diagnostics, Niemcy). Następnie mieszaninę dobrze mieszano i inkubowano 30 min w temp. 55°C. W celu inaktywacji odwrotnej transkryptazy próby podgrzewano w temp. 85°C przez 5 min a następnie umieszczano na lodzie lub w temp. -20°C w celu dłuższego przechowywania. Uzyskany cDNA służył jako matryca do reakcji qRT-PCR.

Tab. 11. Skład zestawu Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (04896866001, Roche Diagnostics, Niemcy).

Odczynnik	Numer katalogowy	Źródło
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/ μl)	04896866001	Roche Diagnostics, Niemcy
Transcriptor RT Reaction Buffer (5x)	04896866001	Roche Diagnostics, Niemcy
Protector RNase Inhibitor (40 U/ μl)	04896866001	Roche Diagnostics, Niemcy
Deoxynucleotide Mix (10mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	04896866001	Roche Diagnostics, Niemcy
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer (50 μM)	04896866001	Roche Diagnostics, Niemcy
Water, PCR-grade	04896866001	Roche Diagnostics, Niemcy

5.4. Amplifikacja cDNA z użyciem metody qRT-PCR

Poziom ekspresji genów *FOXP3*, *CD28*, *GITR* oraz *CTLA-4* oznaczano w dwóch powtórzeniach techniką qRT-PCR z wykorzystaniem zestawu Light Cycler 480[®] Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy), aparatu Rotor Gene 6000 oraz dołączonego do niego oprogramowania w wersji 1.7 (Corbett Research, Australia). Skład użytego zestawu oraz wykorzystanych odczynników spoza zestawu przedstawia tab. 12 i 13.

Reakcje przeprowadzono z użyciem polimerazy typu *hot-start*, nieaktywnej w temp. poniżej 75°C. Enzym aktywowany jest podczas 10-minutowej preinkubacji w temp. 95°C, a proces ten polega na oderwaniu nietrwałych w wysokiej temperaturze grup blokujących aktywność enzymu. Zaletą stosowania polimerazy tego typu jest eliminacja nieswoistych produktów powstających w trakcie składania reakcji.

W reakcjach stosowano znakowane fluorescencyjnie sondy hydrolizujące typu *TaqMan*. W metodzie tej wykorzystuje się swoistą dla amplifikowanego fragmentu DNA sondę, wyznakowaną na końcach cząsteczkami fluorochromów. Na końcu 5' znajduje się znacznik reporterowy a na końcu 3' cząsteczka wygaszająca fluorescencję. Kiedy sonda jest nienaruszona, wygaszacz znajdujący się blisko reportera tłumy jego fluorescencję. Podczas reakcji PCR sonda zostaje zdegradowana dzięki aktywności 5' nukleazowej polimerazy. Rozdział obu fluorochromów umożliwia emisję fluorescencji przez reporter. Wzrost fluorescencji monitorowany jest po każdym zakończonym cyklu elongacyjnym. Poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości powstającego produktu. Użycie sond hydrolizujących typu *TaqMan* znakowanych fluorescencyjnie umiejscowionych pomiędzy parą starterów PCR, rozwiązuje problem nieswoistości fluorescencyjnej obecnej przy zastosowaniu barwnika SYBR Green I.

Zmiany intensywności fluorescencji w przebiegu reakcji qRT-PCR odpowiadają 3 fazom reakcji. Pierwsza charakteryzuje się brakiem przyrostu ilości produktu. W drugiej dochodzi do bardzo szybkiego przyrostu fluorescencji i nazywa się ją fazą logarytmicznego wzrostu. Moment, w którym reakcja amplifikacji wchodzi w tą fazę (C_p , ang. *crossing point*) zależy wyłącznie od początkowej ilości matrycy. W trzeciej fazie następuje zahamowanie przyrostu ilości produktu w wyniku wyczerpania się substratów reakcji amplifikacji i nosi ona nazwę fazy plateau.

Reakcję qRT-PCR przeprowadzono w sterylnych probówkach, do każdej z nich dodając 20 µl mieszaniny reakcyjnej o następującym składzie: 10 µl Light Cycler 480[®]

Probes Master Mix (Roche Diagnostics, Niemcy), 2 μ l mieszaniny starterów (0,5 μ M, Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Polska) i sond (0,2 μ M, Roche Diagnostics, Niemcy), 3 μ l H₂O (Roche Diagnostics, Niemcy) oraz 5 μ l cDNA.

Stosowano następujące pary starterów dla poszczególnych genów w reakcji Real-Time PCR:

GAPDH

forward primer: 5' GCATCCTGGGCTACACTGA 3'

reverse primer: 5' CCAGCGTCAAAGGTGGAG 3'

FOXP3

forward primer: 5' AGGAGGATGGACGAACAGG 3'

reverse primer: 5' CACATCCAGGGCCTATCATC 3'

CD28

forward primer: 5' CATGGCCCAAGTCTGTCTTT 3'

reverse primer: 5' TGTATGTTCGGGCATGCTACT 3'

CTLA-4

forward primer: 5' CCGTGCCCAGATTCTGAC 3'

reverse primer: 5' AAACAACCCCGAACTAACTGC 3'

GITR

forward primer: 5' GACCGAAGACGCCAGAAG 3'

reverse primer: 5' CTCACACCCACAGGTCTCC 3'

Do amplifikacji genów wykorzystywano sondy hydrolizujące typu *TaqMan*; dla genów *GAPDH*, *CTLA-4* oraz *GITR* stosowano sondę nr 82 a dla genów *FOXP3* oraz *CD28* sondę nr 13 (Universal ProbeLibrary Probes, Roche Diagnostics, Niemcy).

Reakcję amplifikacji prowadzono zgodnie z następującym profilem czasowo-temperaturowym:

preinkubacja (aktywacja polimerazy) – temp. 95°C, 10 min

amplifikacja – 55 cykli:

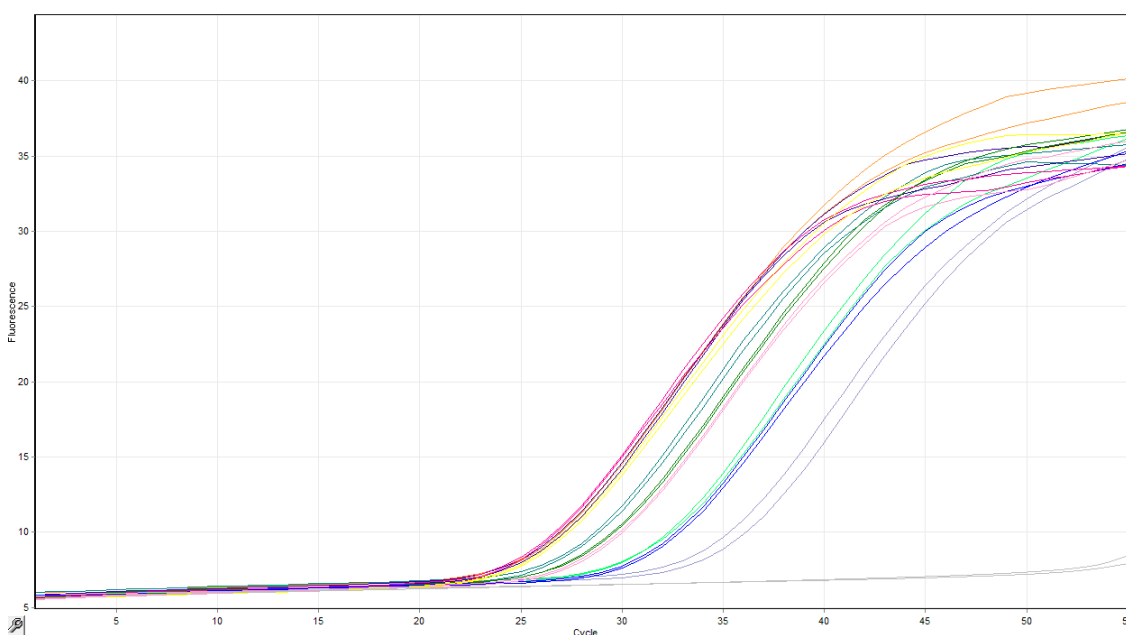
denaturacja (rozdzielenie nici DNA) – temp. 95°C, 10 s

annealing (przyłączanie starterów) – temp. 95°C, 30 s

elongacja (synteza nici komplementarnej) – temp. 72°C, 2 s

chłodzenie aparatu – temp. 40°C, 30 s

Do oceny ekspresji analizowanych genów posługiwano się względną metodą ilościową (ang. *relative quantification*) $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Umożliwia ona ustalenie względnej różnicy między badanymi próbkami (krotności wzrostu, zmiany ilości specyficznego cDNA w badanych grupach). Wyniki oznaczeń ilościowych cDNA badanych genów normalizowano względem genów referencyjnych, czyli cDNA genów konstytutywnych, których ekspresja jest względnie stała, na wysokim poziomie i nie podlega zmianom w grupach badanych. W tym celu wykorzystywano gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH, ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Ryc. 7 przedstawia przykładowy obraz krzywych amplifikacji genu metodą qRT-PCR.



Ryc. 7. Obraz reakcji Real-Time PCR, krzywe amplifikacji genu *CD28* wraz z kontrolą negatywną reakcji (H₂O).

Tab. 12. Skład zestawu Light Cycler 480[®] Probes Master (04707494001, Roche Diagnostics, Niemcy).

Odczynniki	Numer katalogowy	Źródło
Light Cycler [®] 480 Probes Master PCR Mix	04707494001	Roche Diagnostics, Niemcy
Light Cycler [®] 480 Probes Master H ₂ O, PCR-grade	04707494001	Roche Diagnostics, Niemcy

Tab. 13. Odczynniki niezawarte w zestawie Light Cycler 480[®] Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy).

Odczynniki	Numer katalogowy	Źródło
Para starterów dla genu <i>GAPDH</i>	-	Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Polska
Para starterów dla genu <i>FOXP3</i>	-	Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Polska
Para starterów dla genu <i>CD28</i>	-	Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Polska
Para starterów dla genu <i>CTLA-4</i>	-	Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Polska
Para starterów dla genu <i>GITR</i>	-	Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Polska
Universal Probe Library, Probe 082	04689054001	Roche Diagnostics, Niemcy
Universal Probe Library, Probe 013	04685121001	Roche Diagnostics, Niemcy

6. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 6.0 (StatSoft, Inc) oraz Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft).

Prezentowane wyniki badań stanowią średnią (\pm SEM) pomiarów uzyskanych z przeprowadzonych powtórzeń każdego eksperymentu. W analizie zastosowano testy

nieparametryczne w związku z tym, że uzyskane wyniki badań nie były zgodne z rozkładem normalnym. Różnice w odsetku komórek T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+ oraz stężeniu TGF- β 1 pomiędzy 3 badanymi grupami wysięków analizowane były testem Kruskala-Wallisa oraz post testem Dunna a w przypadku 2 grup testem U Manna-Whitneya. Do analizy względnego poziomu transkryptu genów pomiędzy 2 badanymi grupami wysięków wykorzystano test U Manna-Whitneya. Zależność odsetka komórek T regulatorowych od stężenia TGF- β 1 oraz korelacje pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu poszczególnych genów zobrazowano wartością współczynnika korelacji rangowej Spearmana.

Różnice między grupami przyjęto za statystycznie istotne na poziomie istotności:

* dla $p < 0,05$

** dla $p < 0,01$

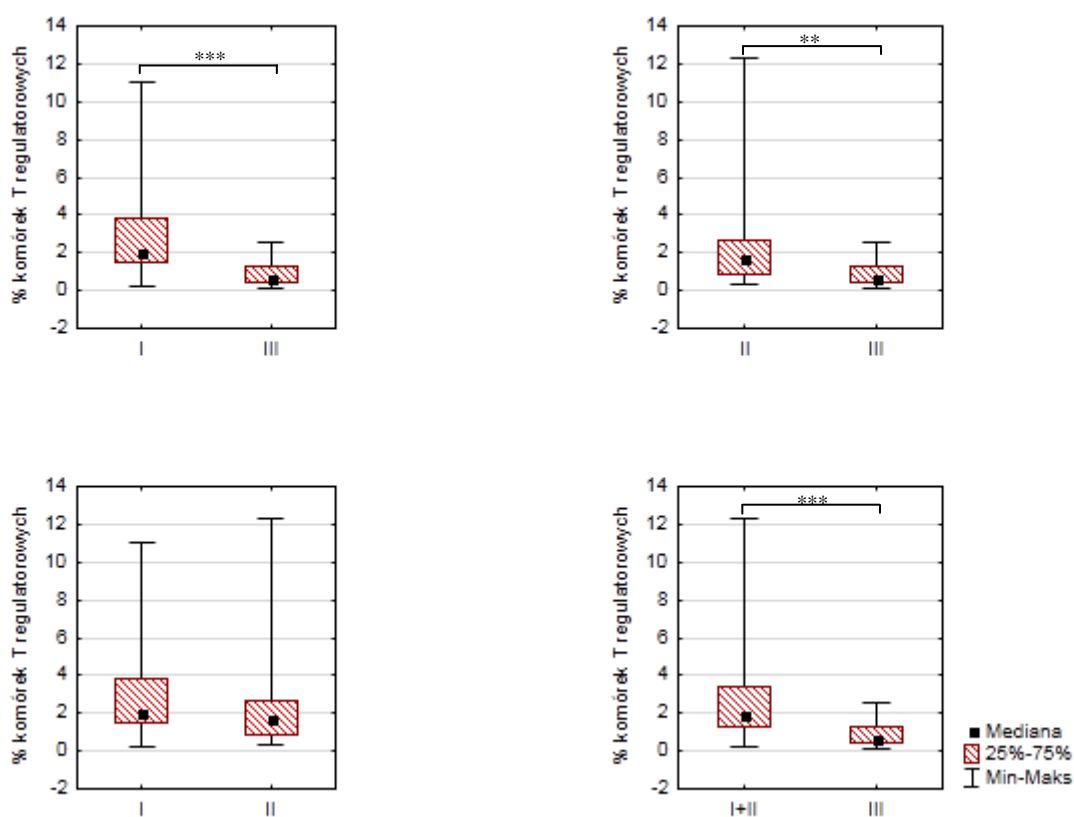
*** dla $p < 0,001$

$p > 0,05$ – brak istotności statystycznej.

WYNIKI

1. Odsetek limfocytów T regulatorowych w wysiękach opłucnowych

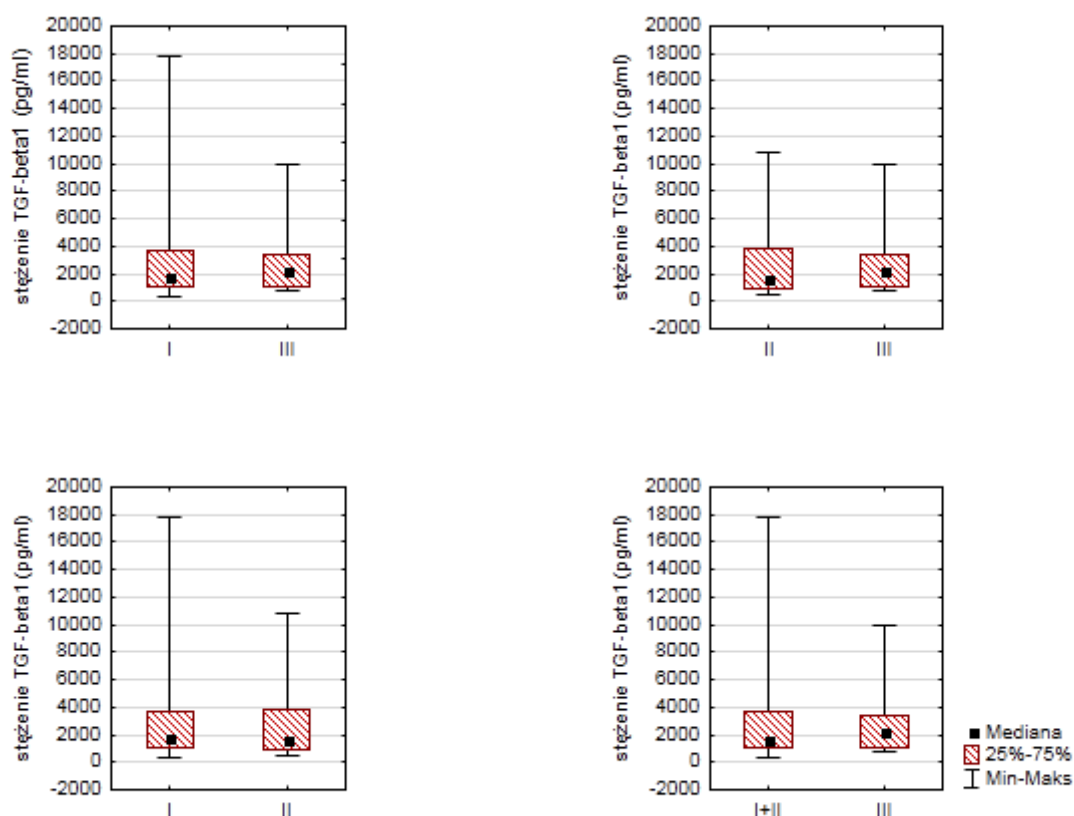
Analiza statystyczna z zastosowaniem testu Kruskala-Wallisa oraz post testu Dunna wykazała różnice istotne statystycznie w zakresie odsetka limfocytów T regulatorowych pomiędzy grupą wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe a grupą wysięków nienowotworowych ($p=0,000009$), pomiędzy grupą wysięków nowotworowych bez komórek nowotworowych a grupą wysięków nienowotworowych ($p=0,0015$) oraz brak różnicy istotnej statystycznie pomiędzy dwoma grupami nowotworowymi ($p=1,00$). Za pomocą testu U Manna-Whitneya wykazano różnice istotne statystycznie pomiędzy sumą grup wysięków nowotworowych a grupą wysięków nienowotworowych ($p=0,000002$) (ryc. 8).



Ryc. 8. Porównanie odsetka limfocytów Treg pomiędzy grupami wysięków opłucnowych; I – nowotworowe wysięki opłucnowe z komórkami nowotworowymi, II – nowotworowe wysięki opłucnowe bez komórek nowotworowych, III – wysięki nienowotworowe; **dla $p<0,01$, ***dla $p<0,001$, $p>0,05$ – brak istotności statystycznej.

2. Stężenie TGF- β 1 w wysiękach opłucnowych

Średnie wartości stężenia TGF- β 1 w nowotworowych wysiękach opłucnowych zawierających komórki nowotworowe kształtowały się na poziomie 2857 pg/ml, w grupie nowotworowych wysięków opłucnowych bez komórek nowotworowych 2999 pg/ml a w grupie wysięków nienowotworowych 2745 pg/ml. Analiza statystyczna z zastosowaniem testu Kruskala-Wallisa oraz post testu Dunna nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy żadną z grup nowotworowych w stosunku do grupy nienowotworowej ($p=1,00$ oraz $p=1,00$), w obrębie grup nowotworowych ($p=1,00$) ani z zastosowaniem testu U Manna-Whitneya pomiędzy sumą grup nowotworowych a grupą nienowotworową ($p=0,9702$) (ryc. 9).



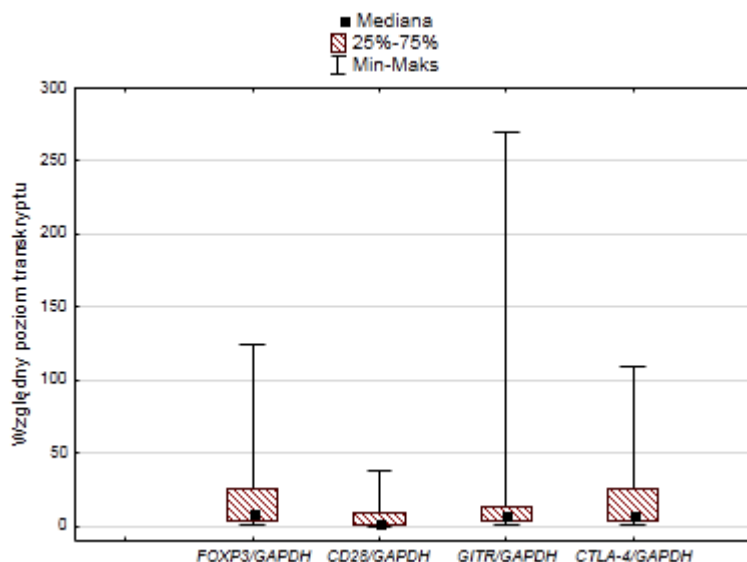
Ryc. 9. Porównanie stężeń TGF- β 1 pomiędzy grupami wysięków opłucnowych; I – nowotworowe wysięki opłucnowe z komórkami nowotworowymi, II – nowotworowe wysięki opłucnowe bez komórek nowotworowych, III – wysięki nienowotworowe; $p>0,05$ – brak istotności statystycznej.

3. Zależność odsetka komórek T regulatorowych od stężenia TGF- β 1 w mikrośrodowisku wysięku opłucnowego

Wartości współczynnika korelacji Spearmana wykazały brak zależności pomiędzy stężeniem TGF- β 1 a odsetkiem komórek T regulatorowych w wysiękach opłucnowych z grupy nowotworowej zawierającej komórki nowotworowe, grupy nowotworowej bez komórek nowotworowych, grupy nienowotworowej ani też z grupy wszystkich nowotworowych wysięków opłucnowych.

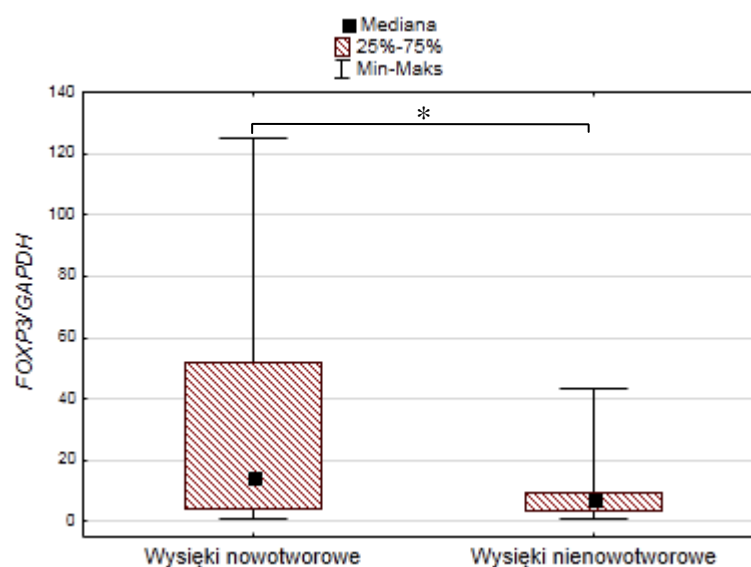
4. Względny poziom transkryptu genów *FOXP3*, *CD28*, *CTLA-4* oraz *GITR* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków opłucnowych

Zaobserwowano wzrost poziomu transkryptu wszystkich 4 analizowanych genów wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych względem poziomu transkryptu wśród komórek CD4+CD25-, który został przyjęty za 1. Poziom transkryptu genu *FOXP3* wzrósł średnio 21-krotnie (mediana 9-krotnie), genu *CTLA-4* 21-krotnie (mediana 8-krotnie), genu *GITR* 23-krotnie (mediana 8-krotnie) a najniższy, bo 8-krotny (mediana 3-krotny) wzrost zanotowano dla genu *CD28* (ryc. 10).

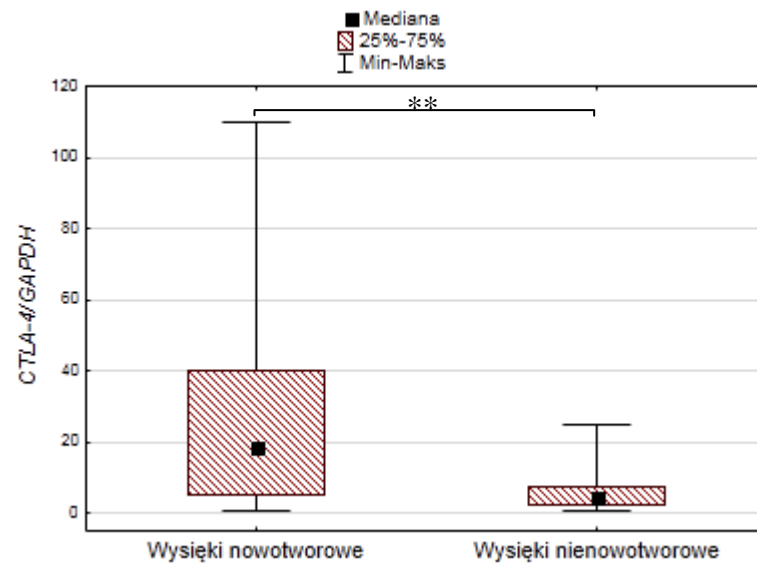


Ryc. 10. Względny poziom transkryptu genów *FOXP3*, *CD28*, *GITR* oraz *CTLA-4* w grupie komórek CD4+CD25+ w stosunku do grupy komórek CD4+CD25-.

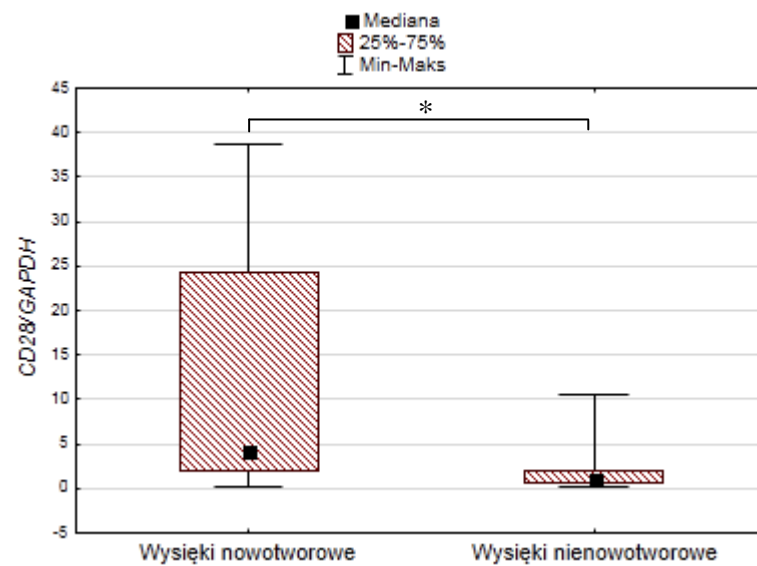
Względny poziom transkryptu poszczególnych genów wśród komórek CD4+CD25+ względem komórek CD4+CD25- został porównany pomiędzy grupą wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe a grupą wysięków nienowotworowych. Dla genu *FOXP3* wynosił on średnio 30 (mediana 15) w grupie nowotworowej i 9 (mediana 7) w grupie nienowotworowej, dla genu *CTLA-4* 32 (mediana 19) w grupie nowotworowej i 7 (mediana 5) w grupie nienowotworowej, dla genu *CD28* 12 (mediana 4) w grupie nowotworowej i 2 (mediana 1) w grupie nienowotworowej oraz dla genu *GITR* 35 (mediana 9) w grupie nowotworowej i 7 (mediana 7) w grupie nienowotworowej. Do analizy statystycznej wykorzystano test U Manna-Whitneya. Istotny statystycznie wzrost względnego poziomu transkryptu w grupie nowotworowej zawierającej komórki nowotworowe w stosunku do nienowotworowej wykazano dla genu *FOXP3* ($p=0,047$), genu *CTLA-4* ($p=0,009$) oraz genu *CD28* ($p=0,017$) (ryc. 11 – 13).



Ryc. 11. Względny poziom transkryptu genu *FOXP3* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i wysięków nienowotworowych; * dla $p<0,05$.

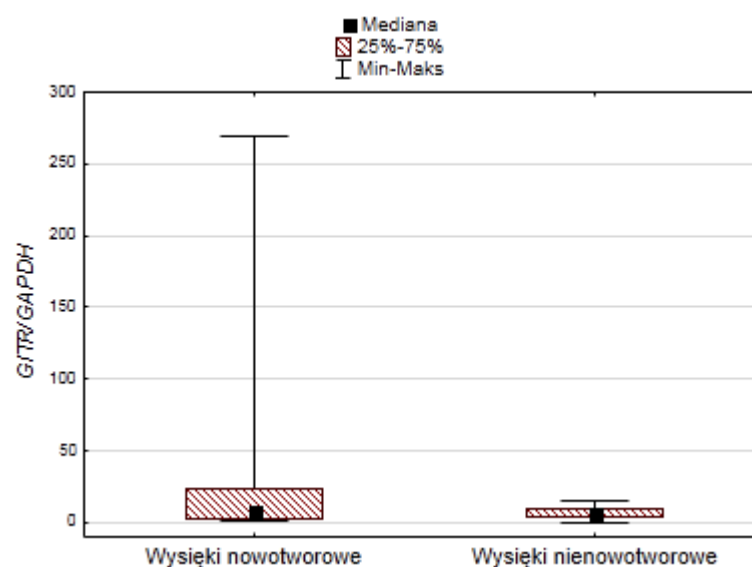


Ryc. 12. Względny poziom transkryptu genu *CTLA-4* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i wysięków nienowotworowych; ** dla $p < 0,01$.



Ryc. 13. Poziom transkryptu genu *CD28* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i wysięków nienowotworowych; * dla $p < 0,05$.

Nie stwierdzono natomiast różnic istotnych statystycznie pomiędzy analizowanymi grupami dla genu *GITR* ($p=0,43$) na podstawie wartości mediany, mimo że wartości średnich względnych poziomów transkryptu w poszczególnych grupach bardzo się różniły (35 vs. 7). Brak różnic istotnych statystycznie wynikał ze znacznych rozrzutów uzyskanych wartości (względny poziom transkryptu: 1 - 270 w grupie nowotworowej, 0,5 - 16 w grupie nienowotworowej) (ryc. 14).



Ryc. 14. Względny poziom transkryptu genu *GITR* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i wysięków nienowotworowych; $p>0,05$ – brak istotności statystycznej.

5. Korelacje pomiędzy wzrostami względnych poziomów transkryptu genów *FOXP3*, *CD28*, *CTLA-4* oraz *GITR* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków opłucnowych

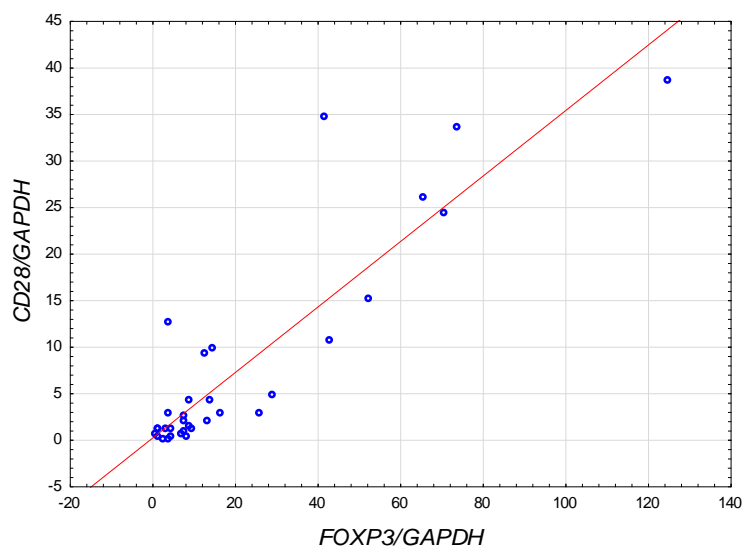
Korelacje pomiędzy wzrostami względnych poziomów transkryptu badanych genów określono wartościami współczynnika korelacji Spearmana (R_s).

Analizą korelacji wzrostów względnych poziomów transkryptu badanych genów objęto komórki CD4+CD25+ pozyskane ze wszystkich wysięków opłucnowych (tab. 14).

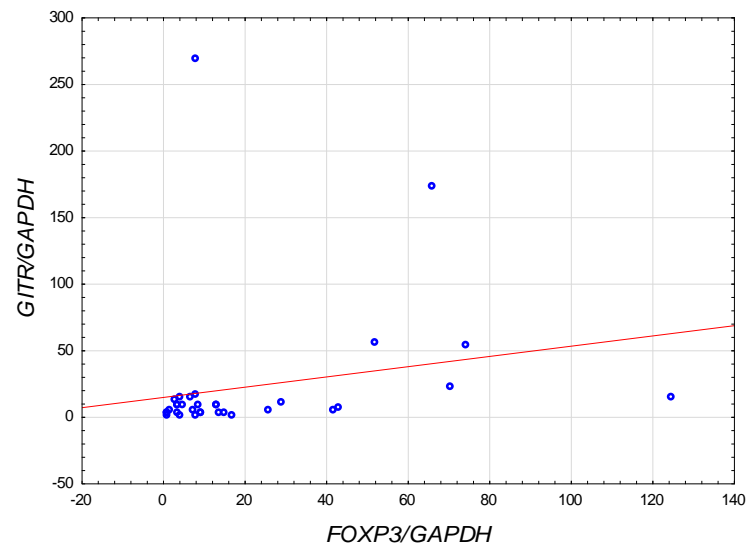
Tab. 14. Wartości współczynnika korelacji Spearmana określające zależności pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu poszczególnych genów wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.

<i>Rs/p</i>	<i>FOXP3</i>	<i>CD28</i>	<i>GITR</i>	<i>CTLA-4</i>
<i>FOXP3</i>	-	<i>Rs=0,794452</i> <i>p=0,0000001</i>	<i>Rs=0,386698</i> <i>p=0,026</i>	<i>Rs=0,749332</i> <i>p=0,000001</i>
<i>CD28</i>	<i>Rs=0,794452</i> <i>p=0,0000001</i>	-	<i>Rs=0,233957</i> <i>p=0,19</i>	<i>Rs=0,892714</i> <i>p=0,0000001</i>
<i>GITR</i>	<i>Rs=0,386698</i> <i>p=0,026</i>	<i>Rs=0,233957</i> <i>p=0,19</i>	-	<i>Rs=0,495655</i> <i>p=0,003355</i>
<i>CTLA-4</i>	<i>Rs=0,749332</i> <i>p=0,000001</i>	<i>Rs=0,892714</i> <i>p=0,0000001</i>	<i>Rs=0,495655</i> <i>p=0,003355</i>	-

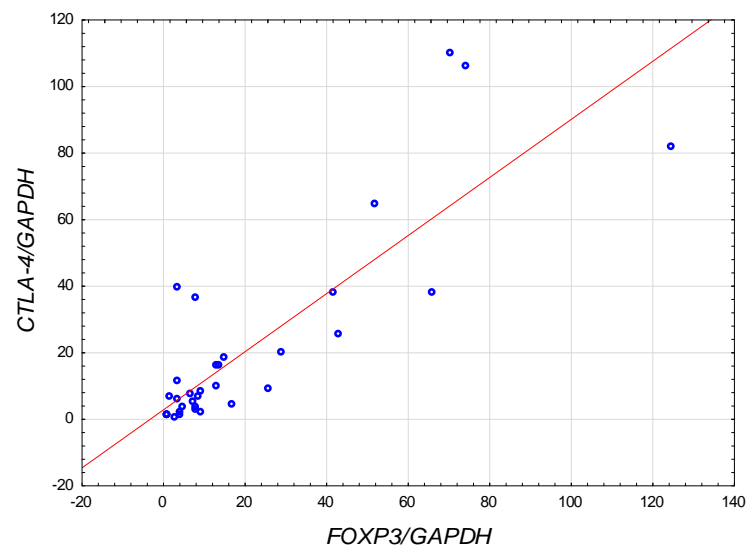
Uzyskane wartości *p* oznaczają, iż wyłącznie korelacja występująca pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genów *CD28* i *GITR* nie była istotna statystycznie (ryc. 15 – 20).



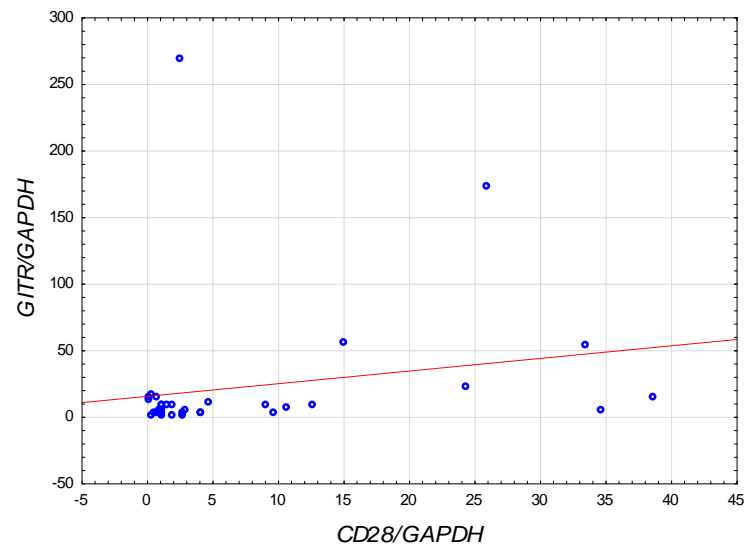
Ryc. 15. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CD28* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.



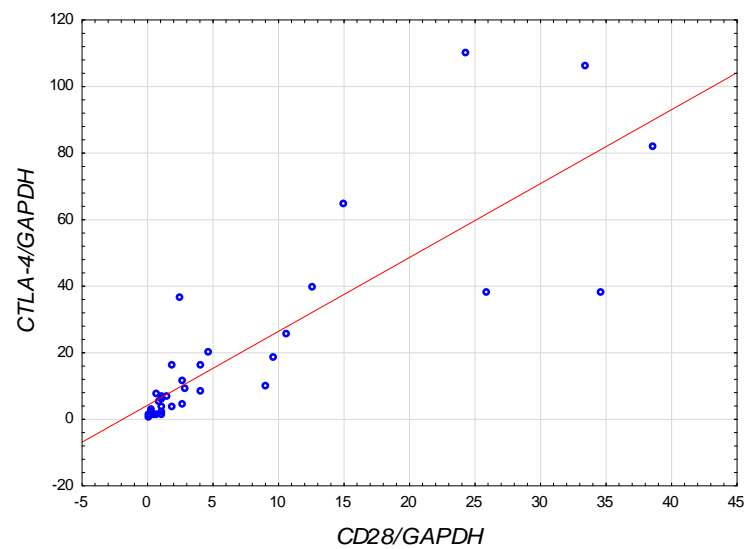
Ryc. 16. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.



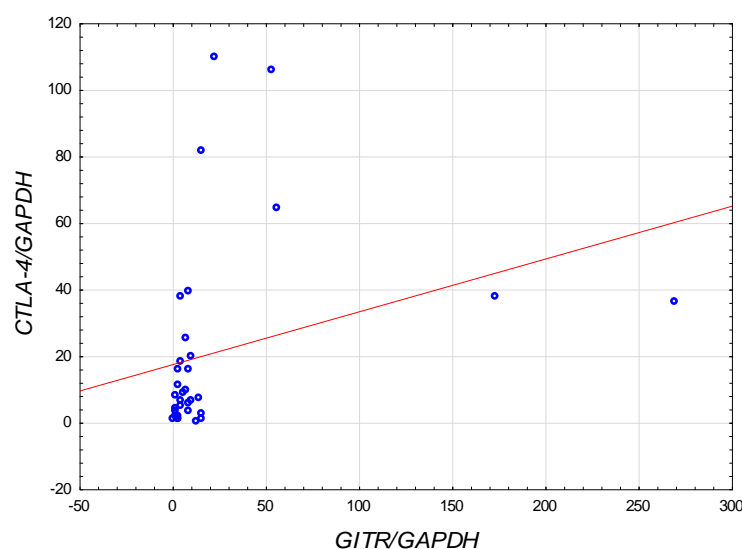
Ryc. 17. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.



Ryc. 18. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *GITR* wśród komórek $CD4+CD25+$ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.



Ryc. 19. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *CTLA-4* wśród komórek $CD4+CD25+$ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.



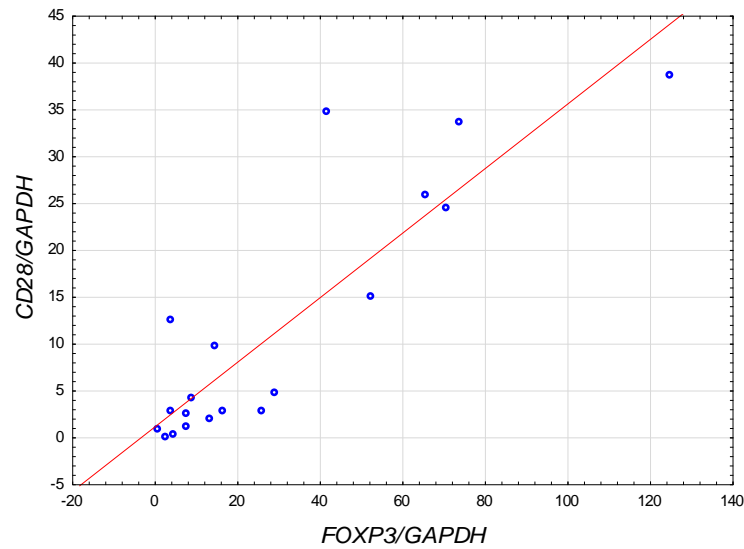
Ryc. 20. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *GITR* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.

Ta sama analiza korelacji wzrostów względnych poziomów transkryptu badanych genów została przeprowadzona wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe (tab. 15).

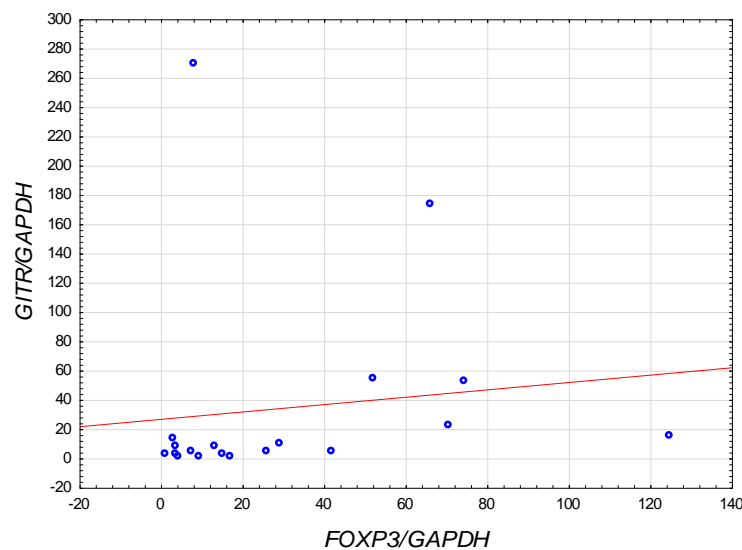
Tab. 15. Wartości współczynnika korelacji Spearmana określające zależności pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu poszczególnych genów wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.

<i>Rs/p</i>	<i>FOXP3</i>	<i>CD28</i>	<i>GITR</i>	<i>CTLA-4</i>
<i>foxp3</i>	-	<i>Rs</i> =0,828070 <i>p</i> =0,000012	<i>Rs</i> =494737 <i>p</i> =0,031	<i>Rs</i> =0,743860 <i>p</i> =0,000261
<i>CD28</i>	<i>Rs</i> =0,828070 <i>p</i> =0,000012	-	<i>Rs</i> =0,412281 <i>p</i> =0,079	<i>Rs</i> =0,868421 <i>p</i> =0,000001
<i>GITR</i>	<i>Rs</i> =494737 <i>p</i> =0,031	<i>Rs</i> =0,412281 <i>p</i> =0,079	-	<i>Rs</i> =0,650877 <i>p</i> =0,002544
<i>CTLA-4</i>	<i>Rs</i> =0,743860 <i>p</i> =0,000261	<i>Rs</i> =0,868421 <i>p</i> =0,000001	<i>Rs</i> =0,650877 <i>p</i> =0,002544	-

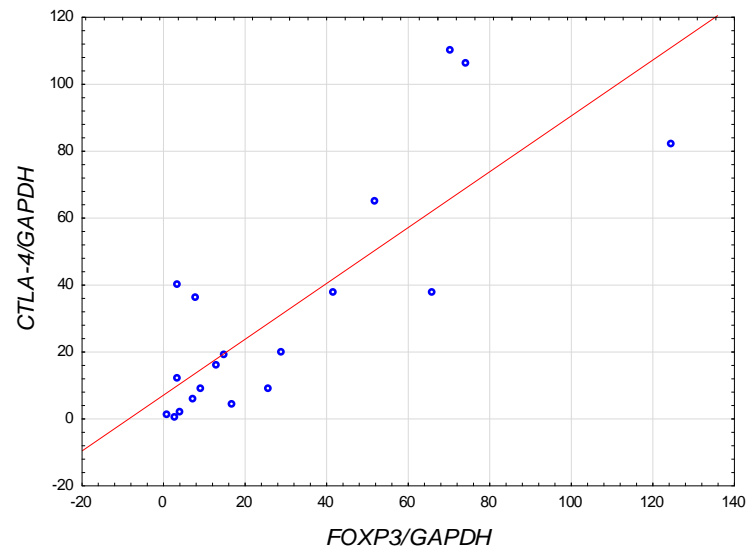
Podobnie jak w przypadku analizy korelacji wzrostu względnego poziomu transkryptu wśród wszystkich komórek CD4+CD25+ względem komórek CD4+CD25-, wyłącznie korelacja występująca pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genów *CD28* i *GITR* nie była istotna statystycznie (ryc. 21 – 26).



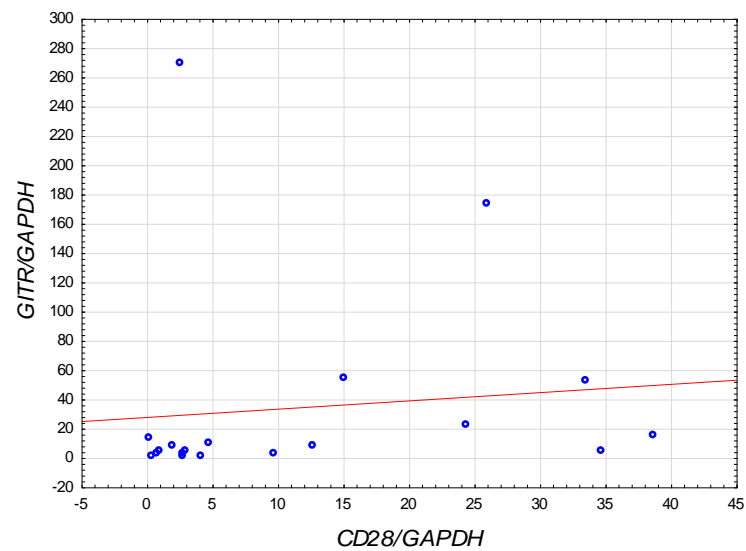
Ryc. 21. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CD28* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wsięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.



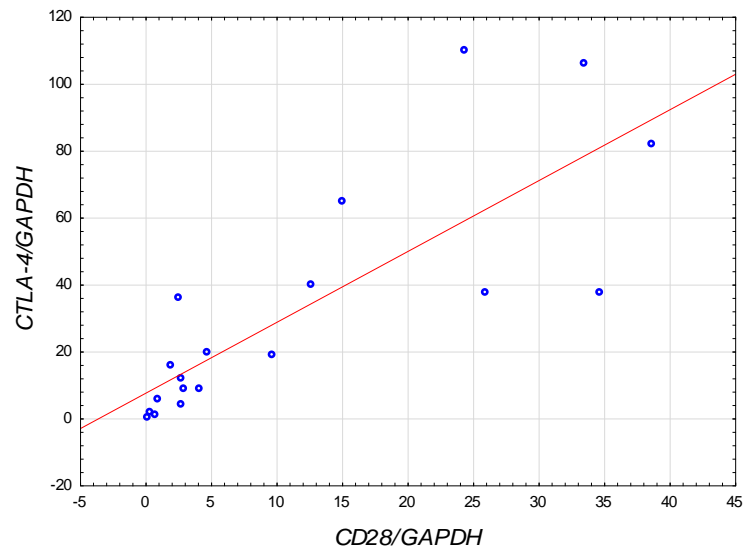
Ryc. 22. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wsięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.



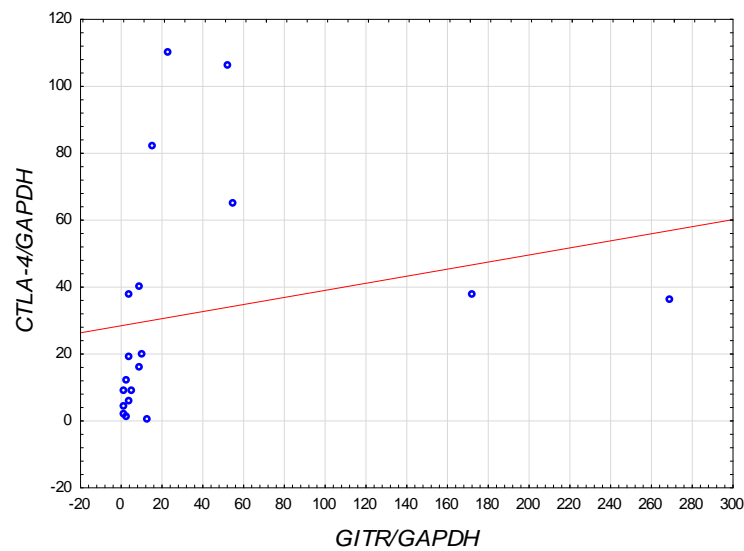
Ryc. 23. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.



Ryc. 24. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.



Ryc. 25. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *CTLA-4* wśród komórek $CD4+CD25+$ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.



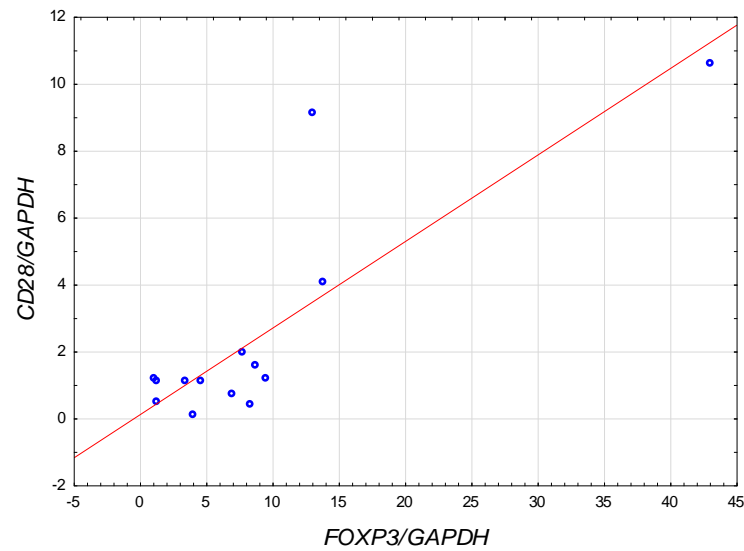
Ryc. 26. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *GITR* i *CTLA-4* wśród komórek $CD4+CD25+$ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.

Analogicznie, analizą korelacji wzrostów względnych poziomów transkryptu badanych genów objęto komórki CD4+CD25+ pozyskane z nienowotworowych wyсіęków opłucnowych (tab. 16).

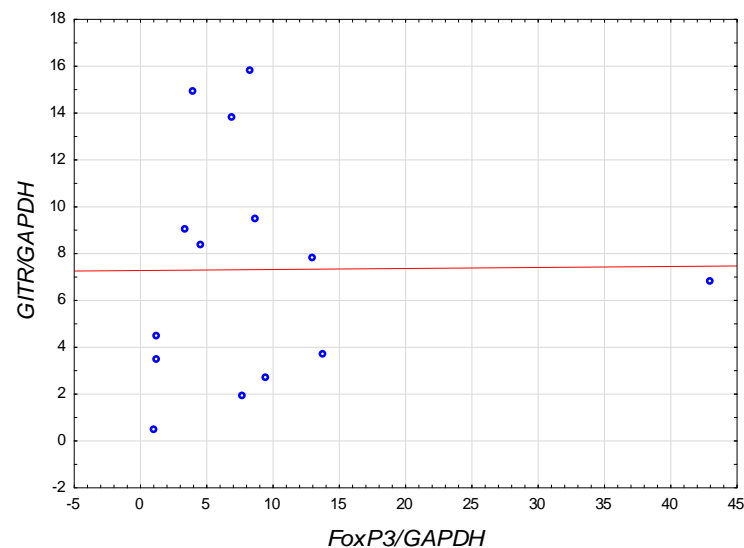
Tab. 16. Wartości współczynnika korelacji Spearmana określające zależności pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu poszczególnych genów wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wyсіęków opłucnowych.

<i>Rs/p</i>	<i>FOXP3</i>	<i>CD28</i>	<i>GITR</i>	<i>CTLA-4</i>
<i>FOXP3</i>	-	Rs=0,652747 p=0,011385	Rs=0,116484 p=0,6916	Rs=0,665934 p=0,009323
<i>CD28</i>	Rs=0,652747 p=0,011385	-	Rs=-0,468132 p=0,0913	Rs=0,617582 p=0,018605
<i>GITR</i>	Rs=0,116484 p=0,6916	Rs=-0,468132 p=0,0913	-	Rs=0,178022 p=0,5425
<i>CTLA-4</i>	Rs=0,665934 p=0,009323	Rs=0,617582 p=0,018605	Rs=0,178022 p=0,5425	-

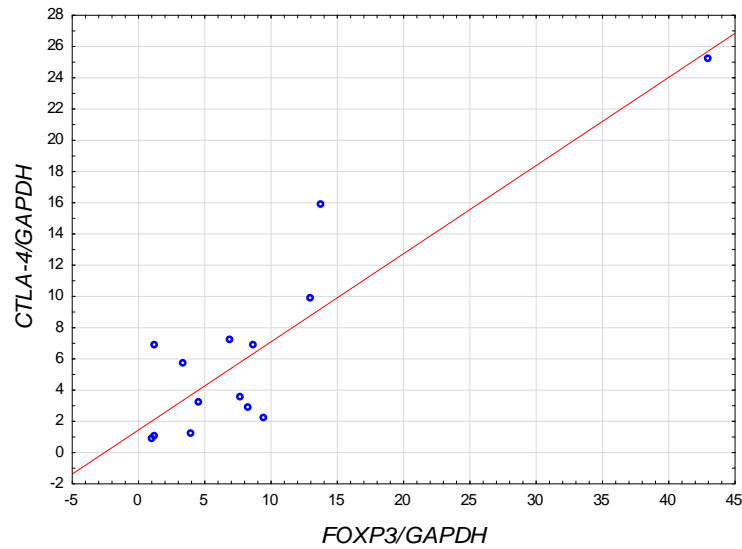
Wyniki analizy pokazały istotną statystycznie korelację pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genów *FOXP3* i *CD28*, *FOXP3* i *CTLA-4* oraz *CD28* i *CTLA-4*, natomiast brak pomiędzy genami *FOXP3* i *GITR*, *CD28* i *GITR* oraz *CTLA-4* i *GITR* (ryc. 27 – 32).



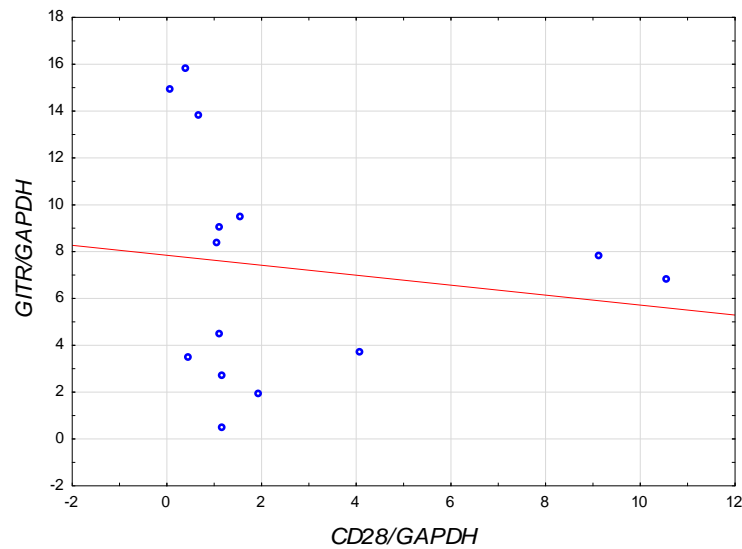
Ryc. 27. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu ranskryptu genu *FOXP3* i *CD28* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.



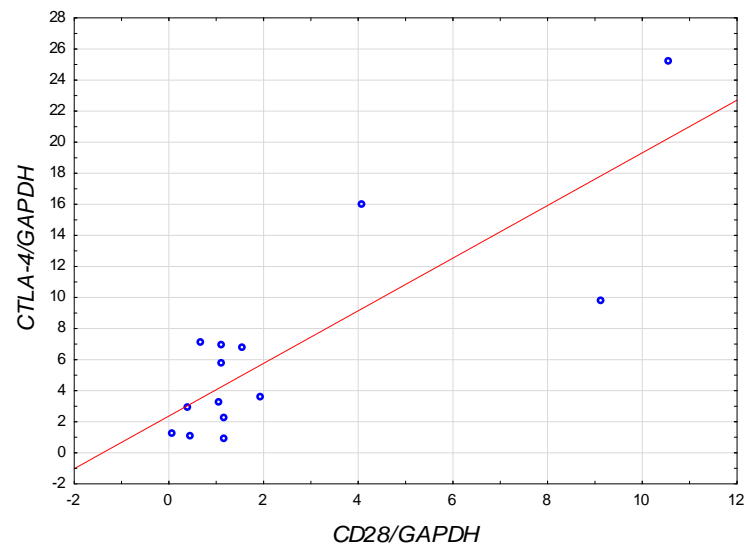
Ryc. 28. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.



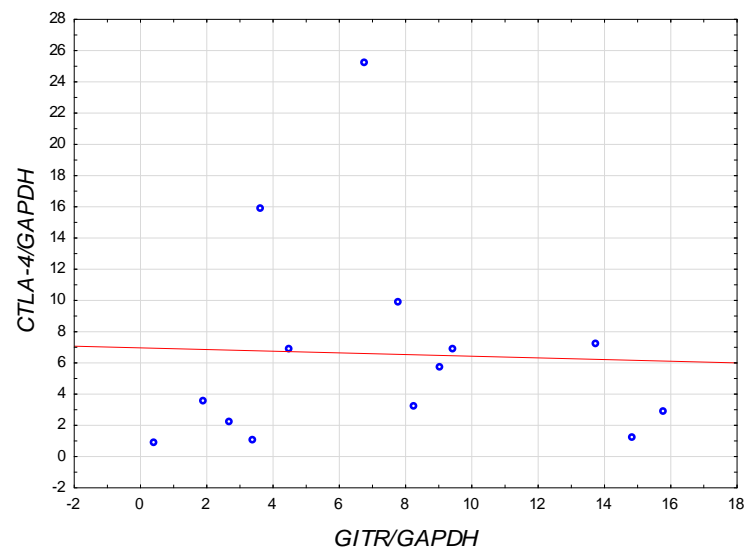
Ryc. 29. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.



Ryc. 30. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.



Ryc. 31. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.



Ryc. 32. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *GITR* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.

DYSKUSJA

Badania nad wysiękami nowotworowymi stwarzają możliwość poznania zależności występujących pomiędzy ludzkim układem odpornościowym i nowotworem. Istotnym wydaje się poznanie mikrośrodowiska wysięku nowotworowego i mechanizmów immunosupresyjnych funkcjonujących w nim. Wśród limfocytów obecnych w wysiękach, komórki Treg stanowią nawet do 30% wszystkich limfocytów [131,132]. Ponieważ nie znaleziono nowotworu w przebiegu którego nie dochodziłoby do generacji Tregs, podejrzewa się, że deplecja tych komórek *in vivo* wzmocniłaby odpowiedź przeciwnowotworową. W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że zastosowanie przeciwciał monoklonalnych przeciw CD25 znacząco wzmocniło odpowiedź przeciwnowotworową poprzez obniżenie liczby komórek CD4+CD25+ *in vivo* [133-135].

Zarówno w krwi obwodowej pacjentów z nowotworami, jak i w mikrośrodowisku nowotworu stwierdza się podwyższony odsetek limfocytów CD4+CD25+FoxP3+ [131,136-139]. Zespół badawczy Mao potwierdził te obserwacje, wykazując znacznie podwyższoną liczbę komórek CD4+CD25+FoxP3+ w krwi pacjentów z nowotworami przełyku, żołądka, płuc oraz rakiem wątrobowokomórkowym w stosunku do krwi osób zdrowych. W obrębie grupy chorych na nowotwór nie wykazano różnic pomiędzy rakami płaskonabłonkowymi a gruczolakorakami, co sugerowało, że mechanizm promujący ekspansję komórek regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+ u pacjentów z różnymi typami histologicznymi raka jest zbliżony [140]. Delong z kolei badał wysięki opłucnowe powstałe w przebiegu NDRP, raka piersi oraz międzybłoniaka. Pomiary cytometryczne wykazały znacznie wyższy odsetek funkcjonalnych komórek CD4+CD25+ w wysiękach opłucnowych w NDRP i raku piersi w stosunku do międzybłoniaka. Zaobserwowano jednakże pewną heterogenność, albowiem pojedynczy pacjenci w obrębie grupy z międzybłoniakiem charakteryzowali się wyjątkowo wysokimi wartościami procentowymi komórek T regulatorowych. Nie wiadomo jednak czy obniżona w stosunku do raków płaskonabłonkowych liczba Tregs w wysiękach w przebiegu międzybłoniaka jest powiązana ze słabszą immunosupresją w tym środowisku. Niewykluczone, że Tregs u pacjentów z międzybłoniakiem są bardziej efektywne w hamowaniu limfocytarnej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Powyższych obserwacji nie potwierdziły pomiary

odsetka komórek T regulatorowych we krwi obwodowej tych samych pacjentów, jako że nie stwierdzono różnic pomiędzy 3 analizowanymi grupami [141].

Wyniki uzyskane w badaniach własnych wykazały różnice istotne statystycznie w odniesieniu do odsetka komórek T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+ pomiędzy grupą wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe a grupą wysięków nienowotworowych, grupą wysięków nowotworowych bez komórek nowotworowych a grupą wysięków nienowotworowych oraz pomiędzy sumą wysięków nowotworowych (z komórkami nowotworowymi i bez) a wysiękami nienowotworowymi. Nie wykazano natomiast różnic istotnych statystycznie pomiędzy obiema grupami wysięków nowotworowych. Wysięki nowotworowe z komórkami nowotworowymi charakteryzowały się najwyższym odsetkiem komórek Treg spośród wszystkich badanych grup. Sugeruje to udział komórek nowotworowych we wzmożonej generacji, proliferacji bądź migracji komórek CD4+CD25+FoxP3+ z obwodu do mikrośrodowiska nowotworu.

Wolf i wsp. stwierdzili, że Tregs izolowane z krwi obwodowej pacjentów nowotworowych charakteryzują się znacznie obniżoną liczbą kolistych cząsteczek DNA - TRECs (ang. *T-cell receptor rearrangements excision circles*), skróconymi telomerami oraz wysoką aktywnością telomerazy. Może to sugerować, że wzrost poziomu tych komórek jest wynikiem aktywnej proliferacji na obwodzie, nie zaś migracji do mikrośrodowiska nowotworu z wtórnych narządów limfatycznych [142]. Jednakże, sama proliferacja nie mogłaby prowadzić do tak znaczącej ekspansji ani tłumaczyć faktu, iż wzrost odsetka komórek CD4+CD25+FoxP3+ korelował ze spadkiem odsetka komórek CD4+CD25- [140,143]. Nowotwór kreuje środowisko zbliżone do chronicznego zapalenia i jest źródłem chemokin odpowiedzialnych za migrację, ale również cytokiny TGF- β . Ostatnie badania sugerują, że konwersja komórek CD4+CD25- w CD4+CD25+FoxP3+ właśnie z udziałem TGF- β może być główną przyczyną podwyższonego poziomu komórek Treg w mikrośrodowisku nowotworu [144,145]. Powstawanie w pełni funkcjonalnych komórek T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+ u pacjentów nowotworowych hamuje odpowiedź przeciwnowotworową i sprzyja rozwojowi nowotworu. W celu udowodnienia tej tezy Valzasina i wsp. przeanalizowali odsetek i funkcje komórek CD4+CD25+FoxP3+ u myszy oraz wykazali ich szybkie, trwające zaledwie 48 dni odradzanie po deplecji przy zastosowaniu przeciwciała monoklonalnego przeciw CD25 oraz tymektomii. Dodatkowo, wskazał konwersję limfocytów CD4+CD25- w komórki

CD4+CD25+FoxP3+, a nie proliferację istniejących komórek Treg, jako główny mechanizm ich rozplemu u myszy z nowotworami, wykazując że procent komórek CD4+CD25- przechodzących w CD4+CD25+FoxP3+ był 2-krotnie wyższy w porównaniu do myszy bez nowotworu [146].

Chcąc udowodnić możliwość transformacji komórek CD4+CD25- w CD4+CD25+FoxP3+ pod wpływem TGF- β [144,145], zespół Mao przeprowadził hodowle komórkowe limfocytów CD4+CD25- wzbogacone supernatantami wysięków nowotworowych oraz mediami otrzymanymi po hodowli komórek nowotworowych z dodatkiem czynników aktywujących TCR, tj. monoklonalnym przeciwciałem przeciw CD3 i IL-2. W obu środowiskach wykazano wcześniej wysoki poziom TGF- β . Cytometryczny pomiar odsetka komórek CD4+CD25+FoxP3+ oraz pomiar poziomu mRNA genu *FOXP3* z zastosowaniem qRT-PCR wykazały, że doszło do konwersji komórek CD4+CD25- w komórki CD4+CD25+FoxP3+. Powstałe komórki prezentowały zdolności supresorowe, podobne do wykazywanych przez powstające w grasicy nTregs, jako że wzrost odsetka komórek CD4+CD25+FoxP3+ był odwrotnie proporcjonalny do zdolności proliferacyjnych i produkcji IFN- γ przez komórki CD4+CD25- w obu hodowlach. Zdolności stymulacyjne użytych supernatantów i mediów były porównywalne, co potwierdziło hipotezę, iż źródłem substancji stymulujących transformację są komórki nowotworowe a głównym czynnikiem odpowiedzialnym za konwersję jest TGF- β . Potwierdzono to eksperymentami z neutralizacją TGF- β przy użyciu przeciwciał monoklonalnych. Stopień konwersji limfocytów znacznie się obniżył, jednakże nadal pozostawał wyższy niż w grupie kontrolnej. Wy tłumaczeniem tego faktu może być niepełne blokowanie TGF- β . Nie można jednak wykluczyć, że w procesie transformacji, poza wspomnianą cytokiną, biorą udział inne, stymulujące związki pochodzenia nowotworowego [140].

Zdolność TGF- β do indukcji komórek supresorowych z CD4+ komórek T u ludzi, pozostaje kwestią sporną. Istnieje wiele danych dowodzących udziału TGF- β w indukcji komórek FoxP3+, jednakże jego rola w indukowaniu funkcji supresorowych jest dyskusyjna. W warunkach *in vitro* neutralizacja TGF- β nie wpływa na zmianę funkcji komórek Treg, natomiast *in vivo* znosi ich ograniczający proces zapalny wpływ w chorobie zapalnej jelit (ang. *inflammatory bowel disease*) i cukrzycy typu I [147,148]. Część autorów uznaje, że TGF- β nie jest w stanie przekształcać komórek CD4+ w supresorowe, jako że komórki Tef aktywowane IL-2 oraz TGF- β po upływie 1 tygodnia nie stawały się anergiczne i intensywnie proliferowały. Tłumaczono to

obecnością nieaktywnej, zmetylowanej formy TGF- β [149]. Inni z kolei zakładają, że po upływie tego czasu komórki T efektorowe są już częściowo zróżnicowanymi komórkami supresorowymi a po ponownej stymulacji stają się anergiczne, wykazują ekspresję błonowego TGF- β a proliferacja innych komórek efektorowych jest znacznie zahamowana. Świadczyłoby to, że zarówno w modelu mysim jak i u ludzi komórki CD4+CD25- są przekształcane w CD4+CD25+FoxP3+ pod wpływem TGF- β , jednakże u człowieka proces ten jest wolniejszy [150].

Pochodzenie TGF- β w płynach wysiękowych nie jest dokładnie poznane. Może się on dostawać pasywnie do wysięku z krwioobiegu, bądź też być syntetyzowany przez komórki międzybłonka lub inne komórki płynu wysiękowego. TGF- β produkowany przez te pierwsze, wzmacnia następnie jego produkcję przez komórki zapalne wysięku. W wysiękach zapalnych dominuje produkcja TGF- β przez komórki międzybłonka opłucnej, natomiast w wysiękach nowotworowych głównie przez komórki nowotworowe [151].

Atanackovic i wsp. wykazali 5-krotnie wyższy poziom TGF- β w wysiękach nowotworowych, u chorych na raka piersi, przełyku, trzustki oraz mięsaka, w stosunku do wysięków nienowotworowych. Analiza poziomu mRNA TGF- β w komórkach wysięku nowotworowego wykazała, że za podwyższony poziom tej cytokiny w mikrośrodowisku nowotworu są odpowiedzialne głównie monocyty ale również limfocyty T oraz komórki nowotworowe. Ponadto, wykazano, że wzmożona, lokalna produkcja TGF- β w mikrośrodowisku nowotworu powiązana jest z wyższym odsetkiem komórek CD4+CD25+FoxP3+. Dowiodła tego analiza z zastosowaniem metody qRT-PCR, która wykazała 3-krotny wzrost ekspresji genu *FOXP3* wśród komórek CD4+ pozyskanych z wysięków, w stosunku do obwodowych CD4+ tego samego pacjenta. U pacjentów z wysiękami nienowotworowymi zależność była odwrotna [152].

Sikora i wsp. otrzymali spójne z powyższymi wyniki w zakresie stężenia TGF- β . Na podstawie analizy nowotworowych i nienowotworowych wysięków opłucnowych wysunięto wniosek o statystycznie istotnym wyższym poziomie cytokiny w grupie nowotworowej w porównaniu z nienowotworową [14].

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pomiarów stężenia TGF- β przeprowadzone na grupie wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe, nowotworowych bez komórek nowotworowych oraz nienowotworowych nie wykazały różnic pomiędzy analizowanymi grupami. Nie zaobserwowano też korelacji pomiędzy odsetkiem limfocytów CD4+CD25+FoxP3+ w poszczególnych grupach a stężeniem

TGF- β . Podobne dane uzyskały inne zespoły badawcze. Cheng i wsp. zbadali stężenie TGF- β w grupach wysięków zapalnych i nowotworowych, nie wykazując istotnych statystycznie różnic [151]. Podobnie Ceyhan i wsp. [153] oraz Chung i wsp. [13]. W odniesieniu do badań własnych nie można jednak wykluczyć, że poziom aktywnego TGF- β *in vivo* koreluje z odsetkiem Tregs. Należy bowiem uwzględnić fakt, że procedura testu immunoenzymatycznego ELISA obejmuje etap aktywacji latentnej formy TGF- β (kompleksy LAP i LTBP). W konsekwencji wyniki testu pokazują stężenie całkowitego TGF- β w wysięku, łącznie z nieaktywnym, nie biorącym udziału w konwersji limfocytów CD4+CD25⁻ w CD4+CD25⁺FoxP3⁺. Nie wiadomo zatem, jakie jest realne stężenie aktywnego TGF- β w badanych wysiękach opłucnowych. Ponadto, TGF- β może występować w formie wolnej, która została zmierzona oraz w formie związanej z błoną komórek Treg. Można więc przypuszczać, że w sytuacji braku różnic w stężeniu wolnej, badanej cytokiny, za wzrost odsetka komórek Treg w mikrośrodku nowotworowego wysięku opłucnowego odpowiedzialne było zjawisko konwersji komórek CD4+CD25⁻ w komórki CD4+CD25⁺FoxP3⁺, właśnie z udziałem błonowego TGF- β . Dodatkowo TGF- β może być produkowany przez inne komórki oprócz nowotworowych, tj. limfocyty T czy makrofagi. Te ostatnie występujące we wszystkich typach wysięków mogą być w dużej mierze odpowiedzialne za wysoki i porównywalny poziom TGF- β we wszystkich analizowanych grupach. Ponadto, w niektórych typach raka, jak np. w raku drobnokomórkowym płuca, komórki rakowe nie produkują TGF- β , o czym świadczy brak jego mRNA w tych komórkach [154]. W tej sytuacji do produkcji TGF- β , na drodze niepoznanych mechanizmów, nowotwór angażuje niedojrzałe, mieloidalne komórki dendrytyczne [123].

Z kolei grupa Duysinx'a mimo, że nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą wysięków nowotworowych i nienowotworowych, zauważyła znaczny wzrost stężenia TGF- β w przypadku wysięków od pacjentów z mięsakiem w stosunku do tych powstałych w następstwie raka płuca. Świadczyłoby to, że różne typy nowotworów wywołują odmienną odpowiedź układu immunologicznego [155]. Wydaje się, że wyniki badań prowadzonych przez zespół Delong'a potwierdziły to przypuszczenie. Pomiary cytokin wykazały, iż w wysiękach pochodzących od pacjentów z międzybłoniakiem poziom VEGF, IL-6, IL-10 oraz TGF- β był wyższy niż w wysiękach pochodzących od pacjentów z NDRP i rakiem piersi. W szczególności dotyczyło to TGF- β , którego poziom był 6-krotnie podniesiony [141]. Podobne wyniki uzyskał Maeda i wsp., w których badaniach poziom TGF- β był 3 - 6-krotnie

podniesiony w wysiękach od pacjentów z międzybłoniakiem w stosunku do innych wysięków [156]. Można to wyjaśnić faktem, że oprócz komórek Treg, wiele innych powiązано z produkcją TGF- β , w tym w dużych ilościach nowotworowe komórki międzybłoniaka [157,158]. Podobnie jak w przebiegu niniejszej pracy, tutaj również nie wykazano pozytywnej korelacji pomiędzy odsetkiem komórek Treg a stężeniem TGF- β .

Tak więc, zależności pomiędzy komórkowymi i cytokinowymi czynnikami immunosupresyjnymi wysięków nowotworowych są zmienne w zależności od typu histologicznego nowotworu, a optymalne terapie przełamujące supresję odpowiedzi antynowotworowej powinny być konstruowane z uwzględnieniem histogenezy nowotworu. Ponadto, powyższe obserwacje sugerują, iż ważnym elementem terapii może być nie tylko selektywna eliminacja komórek T regulatorowych, ale również cytokin immunosupresyjnych.

Ze względu na obecność TGF- β w wysiękach wszystkich badanych grup, można przypuszczać, że w puli znajdujących się w nich limfocytów T regulatorowych większość stanowią indukowane Tregs. TGF- β przekształcając komórki CD4+CD25- w iTregs indukuje w nich ekspresję genu *FOXP3*. Wykazano, że zdecydowana większość wysp CpG promotora genu *FOXP3* w naiwnych komórkach CD4+CD25- jest zmetylowana, podczas gdy w Tregs niemalże wszystkie są zdemetylowane. [159-165]. Zatem mechanizm, za pośrednictwem którego TGF- β wpływa na zwiększenie ekspresji genu *FOXP3*, obejmuje zjawiska epigenetyczne, tj. acetylację histonów w regionie wzmacniacza transkrypcji oraz demetylację wysp CpG w pierwszym intronie genu *FOXP3* [166-168]. Komórki nTreg charakteryzują się całkowitą demetylacją wysp CpG w locus genu *FOXP3* i wykazują stabilną ekspresję FoxP3, podczas gdy powstałe pod wpływem TGF- β komórki iTreg mają w różnym stopniu zdemetylowane wyspy CpG i nie wykazują konstytutywnej ekspresji FoxP3 w sytuacji deficytu TGF- β [159,169]. Ponadto, teoria ekspresji FoxP3 przy udziale TGF- β , prowadząca do powstania iTregs poparta jest faktem, iż Smad3 – czynnik transkrypcyjny aktywowany TGF- β - wiąże się do wzmacniacza transkrypcji, odgrywającego kluczową rolę we wzroście ekspresji genu *FOXP3* [170].

Podłoże molekularne indukcji FoxP3 w rozwijających się komórkach Treg jest kontrolowane przez wiele ścieżek sygnałowych obejmujących receptory limfocytów T (TCR), receptory Toll-podobne (TLR), IL-2, przekaźniki sygnału i aktywatory transkrypcji (STAT), białko Smad, TGF- β , molekuly kostymulujące (CTLA-4, GITR), kinazy PI3K/Akt/mTOR oraz białko Notch [171-173].

Wan i Flavell [20] wykazali na mysim modelu, że kluczowa dla funkcji Tregs i ochrony przed autoimmunizacją jest nie tylko obecność FoxP3 [174,175] ale również poziom jego ekspresji [176]. Obniżony skutkował rozwojem chorób autoimmunizacyjnych. Na podstawie tego zasugerowano, że czynnik transkrypcyjny FoxP3 jest najbardziej specyficznym markerem komórek Treg a jego ekspresja jest unikatową cechą tych komórek [53,177].

Jednakże, z czasem stwierdzono, że ekspresja FoxP3 nie jest ograniczona wyłącznie do komórek T regulatorowych. Mogą ją wykazywać przejściowo aktywowane komórki efektorowe CD4+CD25- w obecności lub przy braku TGF- β , co nie zapewnia im jednak aktywności supresorowej, czy też supresorowe komórki Tr1 i Th3 [40,149,178]. Wykazują ją również komórki nowotworowe [179], np. raka trzustki [180,181], raka piersi [181,182], czerniaka [183] czy niedrobnokomórkowego raka płuca [184]. Obecność nowotworowych komórek FoxP3+ wykazujących aktywność inhibitorową względem proliferujących limfocytów T *in vitro* wraz ze wzrostem odsetka limfocytów T regulatorowych naciekających mikrośrodowisko nowotworu jest negatywnym czynnikiem rokowniczym, prognozującym rozwój choroby i skłonność do przerzutowania [184]. Wyjątkiem jest podtyp raka piersi, charakteryzujący się ekspresją HER-2. Ponieważ FoxP3 może funkcjonować zarówno jako aktywator jak i represor transkrypcji [185], w tym przypadku hamuje transkrypcję dwóch głównych onkogenów w raku piersi – HER-2 oraz SKP-2 [186,187], ma zatem działanie przeciwnowotworowe [182].

W przeprowadzonych w ramach obecnej pracy badaniach poziomu transkryptu genów, w tym *FOXP3*, dzięki zastosowaniu systemu selekcji na złożach magnetycznych analizowane były wyłącznie komórki CD4+CD25+ oraz CD4+CD25-. Ponieważ za właściwe komórki T regulatorowe uważa się tylko te z ekspresją FoxP3, analiza poziomu transkryptu tego genu w puli wyizolowanych komórek CD4+CD25+ i CD4+CD25- pozwoliła na porównanie zawartości komórek Treg w badanych grupach. Poziom ekspresji genu *FOXP3* w grupie komórek CD4+CD25+ był średnio 21-krotnie wyższy (mediana 9-krotnie) w stosunku do grupy kontrolnej, obejmującej komórki CD4+CD25-, co stanowi potwierdzenie dostępnych danych literaturowych [28,52,53]. W grupie komórek CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe poziom transkryptu genu *FOXP3* był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do grupy nienowotworowej. Wyższy poziom transkryptu genu może świadczyć o wyższej ekspresji genu i białka FoxP3 i silniejszych

funkcjach regulatorowych tych komórek. Wykazano, że wzrost ekspresji FoxP3 jest związany z obniżeniem ekspresji czynnika martwicy nowotworów (TNF), IL-2, czynnika stymulującego kolonizację granulocytów i monocytów (GM-CSF) oraz innych pozapalnych cytokin, z drugiej strony zaś z podwyższeniem ekspresji cytokin immunosupresyjnych, tj. IL-10, TGF- β czy oksygenazy hemowej (HO) [168]. Nie można jednak jednoznacznie stwierdzić, czy wzrost poziomu transkryptu wynikał z jego podwyższenia w obrębie subpopulacji Tregs, czy też jej większej liczebności wśród komórek CD4+CD25+ w środowisku wysięków nowotworowych w stosunku do nienowotworowych. System selekcji przeprowadzony na złożach magnetycznych nie pozwolił bowiem na izolację komórek na podstawie obecności czynnika wewnątrzjądrowego, jakim jest FoxP3. Ta ostatnia możliwość byłaby zgodna z zaobserwowanym wcześniej w przebiegu niniejszej pracy, podwyższonym odsetkiem limfocytów Treg CD4+CD25+FoxP+ w grupie nowotworowej.

Potwierdzeniem tej tezy mogą być obserwacje zespołu Xu i wsp., który zbadał zależność pomiędzy odsetkiem komórek T regulatorowych a poziomem mRNA genu *FOXP3* u pacjentów z rakiem przełyku przed i po chemioterapii. W badaniach tych wykazano spadek obu czynników po chemioterapii, sugerując że chemioterapia może blokować ekspresję czynnika FoxP3 na poziomie transkrypcji i obniżać odsetek limfocytów T regulatorowych [188]. Obserwacje te pozostają w zgodzie z danymi innych zespołów [143,189-190]. Trudno określić czy spadek ekspresji genu *FOXP3* był konsekwencją chemioterapii, czy też efektem obniżenia liczby komórek T regulatorowych. Wydaje się jednak, że swoista inhibicja ekspresji genu *FOXP3* może być efektywną strategią terapeutyczną w leczeniu ludzkich nowotworów. Jej efektem może być ilościowe ograniczenie populacji Tregs i w konsekwencji nasilenie odpowiedzi układu immunologicznego. Korelacja występująca pomiędzy odsetkiem komórek Treg a poziomem mRNA genu *FOXP3*, potwierdziła związek tego czynnika transkrypcyjnego z subpopulacją Tregs [188]. Analizowani przeze mnie pacjenci byli pacjentami nieotrzymującymi wcześniej chemioterapii, co może tłumaczyć wysoki poziom transkryptu genu *FOXP3*.

Z kolei Yuan i wsp. przeanalizowali poziom transkryptu genu *FOXP3* i ekspresji białka FoxP3 wśród komórek Treg naciekających nowotwór (TILs) od pacjentów w różnych stadiach raka żołądka. Okazało się, że oba poziomy korelowały ze stadium zaawansowania nowotworu i były najwyższe w IV stadium choroby. Ekspresja białka FoxP3 na komórkę CD4+CD25+FoxP3+ była wyższa w wartowniczych węzłach

chłonnych i wśród limfocytów naciekających nowotwór w porównaniu do krwi obwodowej pacjentów oraz płynu otrzewnowego. Podwyższony poziom mRNA genu *FOXP3* był obserwowany już od II stopnia zaawansowania choroby i wzrastał do IV, pokazując że akumulacja Tregs w tkankach nowotworowych jest obecna już na wczesnych etapach rozwoju nowotworu. Dowodziłoby to, iż poza wzrostem liczby komórek Treg w mikrośrodowisku nowotworu dochodzi również do wzrostu poziomu transkryptu genu *FOXP3* wśród komórek Treg [191].

Zjawisko to jest szczególnie widoczne właśnie w raku płuca, gdzie wzmożona aktywność komórek Treg jest spowodowana wysokim poziomem cyklooksygenazy indukowanej (COX-2) oraz jej produktu - prostaglandyny E₂ (PGE₂). Sharma i wsp. wykazali, że poza hamowaniem apoptozy komórek nowotworowych, wzmacnianiem ich proliferacji i migracji oraz hamowaniem przeciwnowotworowej odpowiedzi efektorowych limfocytów T, PGE₂ indukuje również ekspresję FoxP3 w komórkach CD4+CD25+. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały znaczny wzrost poziomu transkryptu genu oraz białka FoxP3 wśród tych komórek w bogatym w PGE₂ środowisku nowotworowym. Przejawiały one aktywność supresorową, zależną od stężenia PGE₂ [192].

Wydaje się zatem, że uzyskany w toku obecnej pracy wynik może być efektem zarówno wyższego odsetka komórek T regulatorowych wśród komórek CD4+CD25+ w wysiękach nowotworowych, jak i zwiększonego poziomu transkryptu w obrębie subpopulacji Tregs w wyniku stymulujących czynników wydzielanych przez komórki nowotworowe.

Niemniej jednak, wzrost poziomu mRNA genu *FOXP3* w wysiękach nowotworowych pozostawał w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami innych zespołów, wiążących go ponadto ze złym rokowaniem. Niezależnie Wolf i wsp. [131], Matsuura i wsp. [193] oraz Gutpa i wsp. [194] analizowali poziom transkryptu *FOXP3* u chorych na raka piersi i zaobserwowali zgodnie znaczącą korelację pomiędzy jego wysokim poziomem, stopniem zaawansowania choroby, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych oraz krótszym czasem przeżycia wśród pacjentek wykazujących obecność receptorów estrogenowych lub progesteronowych. Również w raku jajnika zespół Wolf i wsp. powiązał wysoki poziom mRNA genu *FOXP3* ze złą prognozą, w szczególności ze skróceniem całkowitego czasu przeżycia oraz przeżycia wolnego od progresji nowotworu. U pacjentek z niskim poziomem mRNA *FOXP3* ryzyko wznowy lub śmierci było zredukowane o 60% [195]. Gorsze rokowanie powiążane z wysokim

poziomem mRNA *FOXP3* wykazali także Capriotti i wsp. na przykładzie skórno-łoniaka T-komórkowego. Niemniej jednak poziom transkrypty genu *FOXP3* nie był traktowany jako czynnik rokowniczy ze względu na brak korelacji pomiędzy nim a ekspresją białka [196]. Fakt ten może być wynikiem zmian zachodzących na poziomie post-translacyjnym [181].

W sprzeczności z powyższymi pozostają wyniki Alvaro i wsp. przeprowadzone na pacjentach z ziarnicą złośliwą, u których wysoki poziom ekspresji genu *FOXP3* powiązano z lepszą przeżywalnością [197]. Wy tłumaczeniem wydaje się być fakt, iż komórki T regulatorowe mogą bezpośrednio hamować proliferację komórek nowotworowych jeśli wywodzą się one z linii komórek B, jak ma to miejsce w przypadku ziarnicy złośliwej. Dowiedziono tego na mysich modelach, przedstawiających bezpośredni efekt hamujący komórek T regulatorowych na funkcje i przeżycie limfocytów B [198,199].

Różnice w poziomie transkrypty genu *FOXP3* w obrębie analizowanych grup mogą wynikać, z przyczyn wspomnianych powyżej, będących wynikiem supresyjnego wpływu mikrośrodowiska nowotworu na układ immunologiczny. Istnieją jednak doniesienia, mówiące iż możliwa jest utrata ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3 w Tregs pod wpływem aktywacji w środowisku cytokin prozapalnych [200-202] lub limfopenicznym [200,203]. Odbywa się to na drodze zależnej od IL-6, która wzmacnia ekspresję oraz aktywność DNMT1. Ta z kolei, metylując wzmacniacz transkrypcji genu *FOXP3* obniża jego ekspresję, osłabiając tym samym supresorowe funkcje Tregs [169,204,205]. Co więcej zauważono, iż komórki Treg w następstwie obniżenia ekspresji FoxP3 wykazywały wzrost ekspresji cząsteczek charakterystycznych dla subpopulacji limfocytów Th2 [206] i Th17 [202] oraz spadek tych charakterystycznych dla komórek Treg.

Zjawisko to, jak pokazały eksperymenty prowadzone przez Hansmanna i wsp., dotyczyło wyłącznie komórek pamięci CD45RA⁻, podczas gdy naiwne CD45RA⁺ Tregs prezentowały stały poziom ekspresji FoxP3 [204]. Informacja ta może mieć znaczenie przy wyborze komórek Treg do celów terapeutycznych, wskazując na przydatność wyłącznie naiwnych komórek CD45RA⁺.

W chwili obecnej nie jest jasne czy powstawanie komórek Th z FoxP3⁺ jest wynikiem ich plastyczności środowiskowej czy też jest to mała populacja nieregulatorowych komórek powstających już we wczesnej ontogenezie, które wykazują przejściową ekspresję FoxP3, tracąc ją i przekształcając się w komórki Th

w środowisku zapalnym lub limfopenicznym [207]. W obecnej pracy grupa wysięków nienowotworowych była w przeważającej mierze grupą wysięków zapalnych, co świadczyłoby o możliwości obniżonego poziomu transkryptu genu *FOXP3* w tej grupie właśnie w wyniku jednego z wymienionych zjawisk.

Należy nadmienić, iż poziom transkryptu genu *FOXP3*, mimo że znacznie podwyższony w grupie komórek CD4+CD25+, był również obserwowany wśród komórek grupy kontrolnej CD4+CD25-. Wy tłumaczeniem tego stanu rzeczy może być fakt, że ekspresję FoxP3 poza komórkami Treg oraz wspomnianymi wcześniej komórkami nowotworowymi, mogą również wykazywać w sposób krótkotrwały aktywowane komórki T efektorowe CD4+CD25-, w obecności lub przy braku TGF- β . Ta przejściowa ekspresja nie nadaje im jednak aktywności supresorowej. Innymi komórkami CD4+ mogącymi wykazywać przynajmniej przejściową ekspresję FoxP3 są komórki regulatorowe Tr1 i Th3 [39]. Stąd grupa kontrolna, obejmująca wszystkie komórki CD4+, może wykazywać pewien poziom ekspresji FoxP3.

Argumenty te przemawiają za faktem, że ekspresja czynnika transkrypcyjnego FoxP3 nie jest cechą jednoznacznie określającą subpopulację limfocytów T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+. Mogą ją bowiem przejściowo przejawiać komórki T efektorowe, regulatorowe Tr1 i Th3 lub nowotworowe a same komórki Treg mogą ją tracić, przeistaczając się w komórki pomocnicze Th2 lub Th17. Zatem, w celu trafnego zidentyfikowania tej subpopulacji limfocytów T należy uwzględnić ekspresję innych, charakterystycznych dla niej cząsteczek, takich jak CTLA-4 czy GITR.

Podczas gdy cząsteczka CD28 ulega ekspresji na powierzchni większości spoczynkowych i aktywowanych limfocytów T, obecność CTLA-4 jest ograniczona wyłącznie do limfocytów T aktywowanych. Mimo podobieństw strukturalnych, receptory te pełnią funkcje antagonistyczne: CD28 promuje odpowiedź T-komórkową, wpływając na aktywację i proliferację limfocytów T oraz produkcję cytokin, CTLA-4 zaś ją hamuje. Wyjątkiem są limfocyty T regulatorowe, które charakteryzują się konstytutywną ekspresją cząsteczki CTLA-4. Inhibitorowa rola CTLA-4 w funkcjonowaniu Tregs jest nadal kontrowersyjna. Z jednej strony myszy z wyłączonym genem *CTLA-4* wykazują ekspresję FoxP3 i funkcje supresorowe [93], z drugiej zaś strony stosowanie przeciwciał monoklonalnych przeciw CTLA-4 mimo, że nie wpływa na ich rozwój, znosi supresorowe funkcje Tregs *in vivo* i *in vitro* [94,208]. Jak pokazały eksperymenty z udziałem retrowirusowej transfekcji, zdolności supresorowe korelowały z wyższym poziomem ekspresji CTLA-4. Zarówno Wing

i wsp. [94], jak i Schmidt i wsp. [209] zaobserwowali, że inkubacja CTLA-4+ komórek Treg z komórkami prezentującymi antygen obniżało ekspresję cząsteczek CD80 i CD86 na powierzchni tych ostatnich. Ponieważ cząsteczki z grupy B7 są ligandami zarówno dla CTLA-4, jak i CD28, ich deficyt hamuje CD28-zależną aktywację limfocytów T efektorowych. Komórki T regulatorowe zapewne korzystają z wielu mechanizmów immunosupresji, jednak defekt mechanizmu przebiegającego z udziałem cząsteczki CTLA-4 pozbawia komórki Treg zdolności do utrzymania tolerancji immunologicznej, nawet gdy inne mechanizmy stają się bardziej aktywne aby go zrekompensować. Jest więc CTLA-4 cząsteczką zaangażowaną w supresorowe funkcje komórek Treg. Natomiast receptor CD28 spełnia najprawdopodobniej tą samą funkcję w komórkach T regulatorowych jak i T efektorowych, czyli promuje ich proliferację i przetrwanie.

Zmierzony w przebiegu obecnej pracy poziom transkryptyu genu *CTLA-4* w grupie komórek CD4+CD25+ był 21-krotnie wyższy (mediana 8-krotnie) niż w grupie komórek CD4+CD25- i korelował ze wzrostem poziomu transkryptyu genu *FOXP3*. Obserwacje te pozostają w zgodzie z danymi uzyskanymi przez Zheng i wsp., którzy wykazali podniesiony w stosunku do limfocytów T efektorowych poziom ekspresji obu receptorów w komórkach T regulatorowych oraz występującą pomiędzy nimi korelację [210]. Badania te zostały przeprowadzone na poziomie białka i sugerowały, iż czynnik transkrypcyjny FoxP3, wraz z innymi takimi jak NFAT, może być regulatorem promotora transkrypcji genu *CTLA-4* [211]. Sugerowałoby to, iż zdolność FoxP3 do wywoływania funkcji supresorowych w komórkach Treg, zależy od jego poziomu i zdolności do promowania ekspresji CTLA-4. Jednakże obserwacje Zheng i wsp. pokazały, że FoxP3 nie jest absolutnie potrzebny do ekspresji CTLA-4, jako że komórki transfekowane *CTLA-4* nie zawsze wykazywały ekspresję FoxP3 [210]. Przeciwnie, najnowsze doniesienia sugerują, że to CTLA-4 może prowadzić do powstawania FoxP3+ komórek Treg. Miałoby to się odbywać na drodze tworzenia kompleksów CTLA-4 z MHC II oraz TCR pomiędzy limfocytami T a komórkami prezentującymi antygen w czasie ich aktywacji. Proces ten miałby być zależny od endogennej produkcji TGF- β [212,213].

Porównując wyniki przeprowadzonych badań zaobserwowano znacznie wyższy poziom transkryptyu genu *CTLA-4* w grupie komórek CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe w stosunku do tych otrzymanych z wysięków nienowotworowych. Obserwacje te były spójne

z dokonanymi przez inne zespoły na grupach pacjentów nowotworowych w innych typach raka.

Rak piersi wydaje się być najlepiej przebadanym nowotworem pod kątem ekspresji genu i białka CTLA-4. Jaberipour i wsp. przeprowadzili badania poziomu transkryptu genu *FOXP3* oraz *CTLA-4*, wykazując znaczny ich wzrost w komórkach jednojądrzastych u pacjentek z rakiem piersi w stosunku do grupy kontrolnej. Ponadto, została wykazana znaczna korelacja pomiędzy wzrostem transkryptu obu genów w grupie pacjentek z rakiem piersi. W przypadku genu *CTLA-4* wzrost był 16-krotnie wyższy u pacjentek we wczesnym stadium choroby, 12-krotnie wyższy u pacjentek bez przerzutów oraz 10-krotnie wyższy u pacjentek o niskim stopniu złośliwości raka w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast ekspresja mRNA genu *FOXP3* była 19-krotnie wyższa we wszystkich trzech grupach pacjentek w stosunku do grupy kobiet bez nowotworu. Obserwowany znaczny wzrost poziomu transkryptów u pacjentek we wczesnym stadium choroby świadczył, że komórki T regulatorowe są funkcjonalne już w początkowych etapach rozwoju raka piersi. Podobnie jak w przedstawionych w ramach pracy doktorskiej wynikach, zaobserwowano, iż wyższa ekspresja mRNA *CTLA-4* we krwi obwodowej pacjentek korelowała z wyższą ekspresją mRNA *FOXP3* [214].

Z kolei Bi i wsp. zmierzili poziom mRNA genu *CTLA-4* w niezmiennych i objętych rakiem piersi tkankach, wykazując istotny statystycznie wzrost wśród pacjentek, który korelował ze stopniem zaawansowania choroby [215]. Również Ohara i wsp. potwierdzili te obserwacje, wykazując wzrost poziomu mRNA *CTLA-4* w tkankach pozyskanych od pacjentek we wczesnych i późnych stadiach raka piersi w stosunku do zdrowej grupy kontrolnej [216]. Kosmaczewska i wsp. potwierdzili tą tendencję na poziomie białka wśród pacjentek z rakiem szyjki macicy, wskazując na odmienną kinetykę ekspresji CTLA-4, powiązaną z wcześniejszą i silniejszą inhibicją limfocytów T efektorowych w porównaniu do osób zdrowych [217].

Wyjątkiem były wyniki badań przeprowadzone przez Lee i wsp. na grupie pacjentów z rakiem jelita grubego. W przeciwieństwie do powyższych doniesień, zaobserwowali oni spadek poziomu transkryptu genu *CTLA-4* we wszystkich stadiach choroby nowotworowej w porównaniu z grupą nienowotworową [218].

We wszystkich powyższych przypadkach analizy przeprowadzone na tkankach, komórkach jednojądrzastych lub całkowitej populacji limfocytów T, nie pozwalały na odnoszenie ekspresji CTLA-4 wyłącznie do subpopulacji Tregs.

Podobnie jak w przypadku wszystkich komórek CD4+CD25+, w badaniach obejmujących niniejszą pracę doktorską, występowała korelacja pomiędzy wzrostem poziomu transkryptu genu *CTLA-4* i *FOXP3* w obrębie grup, choć słabsza niż w grupie wszystkich komórek CD4+CD25+. W przypadku grupy nowotworowej wytłumaczeniem tego zjawiska może być fakt, iż silna korelacja pomiędzy poziomem transkryptu obu genów występuje po aktywacji komórek T regulatorowych i utrzymuje się do momentu podjęcia przez nie podziałów komórkowych, kiedy to ekspresja FoxP3 spada [210]. A zatem w środowisku nowotworowym, w którym notuje się wyższy odsetek komórek Treg, częściej dochodzi do podziałów komórkowych i utraty ekspresji FoxP3. Natomiast jeszcze słabsza, mimo że wciąż istotna statystycznie, korelacja pomiędzy wzrostami transkryptu obu genów obserwowana w grupie wysięków nienowotworowych może być efektem niższego odsetka limfocytów T regulatorowych w grupie komórek CD4+CD25+. Pociągnęłoby to za sobą obniżenie poziomu transkryptu genów *FOXP3* i *CTLA-4* z komórek T regulatorowych, natomiast poziom mRNA *CTLA-4* pochodzącego z aktywowanych limfocytów T efektorowych znajdujących się wśród komórek CD4+CD25+ nie uległby zmianie. W efekcie poziomy ekspresji mRNA *CTLA-4* i *FOXP3* mogłyby nie wzrastać proporcjonalnie.

W chwili obecnej dostępna jest duża ilość doniesień dotyczących poziomu ekspresji innych molekuł o charakterze inhibitorów oraz ich ligandów w populacji obwodowych limfocytów T. Loos i wsp. wykazali podniesiony poziom ekspresji genów receptorów CTLA-4 i PD-1 oraz ich ligandów B7-1, B7-2, B7-H1, B7-DC w raku trzustki, wykazując ponadto, iż B7-H1-dodatnie nowotwory charakteryzowały się wyższym odsetkiem komórek Treg w stosunku do B7-H1-ujemnych, będąc tym samym bardziej opornymi na odpowiedź antynowotworową [219]. Również Thomson i wsp. wykazali na przykładzie raka nerki związek ligandu B7-H1 ze złym rokowaniem, szybkim tempem rozwoju choroby, skłonnością do tworzenia przerzutów i w końcu podniesionym ryzykiem śmierci [220]. Z kolei ligand B7-H4 ulegał nadekspresji w raku jajnika [221]. Oddziaływania pomiędzy receptorami PD-1 oraz PD-2 (ang. *programmed death*) i ich ligandami PD-L1, PD-L2 zostały również powiązane z ucieczką nowotworu spod kontroli układu immunologicznego. Analizy ekspresji wspomnianych receptorów oraz ich ligandów na poziomie transkryptu oraz białka przeprowadzone na grupie pacjentów z rakiem przełyku [222] oraz trzustki [223] wykazały, iż pacjenci z podwyższonym ich poziomem mają mniejszą szansę na przeżycie. Zatem ekspresja receptorów limfocytów T o charakterze inhibitorowym oraz ich ligandów może być

czynnikiem rokowniczym w przebiegu choroby a interakcje zachodzące pomiędzy nimi celem terapii antynowotworowej.

Obecnie duże zainteresowanie skupia się na obecności cząsteczki CTLA-4 w komórkach nowotworowych. Mimo, że jej obecność została wykazana w tkankach pacjentów z NDRP [224], prognostyczna rola wysokiego poziomu mRNA *CTLA-4* oraz ekspresji tej cząsteczki w szybkiej progresji choroby została jak dotąd wykazana tylko na grupie pacjentek z rakiem piersi [225]. Przeciwnie, w CLL wysoki poziom mRNA genu *CTLA-4* został powiązany z dobrym rokowaniem, sugerując inhibitorowy wpływ receptora CTLA-4 na rozrost komórek B-CLL [226].

W przeciwieństwie do powyższych obserwacji, Salvi i wsp. zaobserwowali 1,5-krotny wzrost ekspresji CTLA-4 w niedrobnokomórkowym raku płuca w stosunku do pozostałych typów histologicznych, co było powiązane z lepszym rokowaniem [227]. Tłumaczyć to można faktem, iż CTLA-4 przekazuje negatywny sygnał komórkom rakowym, tak jak to ma miejsce w przypadku limfocytów T efektorowych. Oddziaływania CTLA-4 na powierzchni komórek NDRP z ligandami B7 na powierzchni komórek z mikrośrodowiska nowotworu, prowadzą do inhibicji proliferacji komórek raka płuca i indukcji ich apoptozy [228,229].

Podobnie jak w przypadku ekspresji genu *CTLA-4* zauważalny był także istotny statystycznie wzrost poziomu transkryptu genu *CD28* wśród komórek CD4+CD25+ w stosunku do komórek CD4+CD25-. W porównaniu do wzrostów obserwowanych w przypadku pozostałych analizowanych genów, był on najniższy, bo niespełna 8-krotny (mediana 3-krotny).

Sygnalizacja na drodze kontaktów receptora CD28 z cząsteczkami z grupy B7 jest kluczowa dla aktywacji i różnicowania limfocytów T, w tym Tregs [230]. Sygnał płynący ze tych oddziaływań aktywuje komórki T poprzez obniżanie progu sygnalizacji TCR, indukowanie i utrzymywanie produkcji IL-2 [231] oraz wzmaganie ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-xl [51,232]. Brak wywieranej przez CD28 stymulacji prowadzi do nieefektywnego powstawania i proliferacji limfocytów T *in vitro* i *in vivo* [233], czyli ich anergii i apoptozy. Potwierdziły to obserwacje myszy pozbawionych receptora CD28 lub z blokadą oddziaływań CD28-CD80/86, u których dochodziło do obniżenia reakcji na patogeny infekcyjne i antygeny allograftów oraz ograniczenia GvHD i astmy [234,235]. Brak CD28 skutkuje zarówno spadkiem aktywności i liczby antynowotworowych komórek T efektorowych, jak i limfocytów T regulatorowych. Występowanie na powierzchni komórki T efektorowej receptora CD28 nie jest

ograniczone, jak w przypadku cząsteczki CTLA-4, wyłącznie do stanu aktywacji. Wydaje się więc, że powszechna obecność CD28 zarówno na spoczynkowych jak i aktywowanych limfocytach T efektorowych i regulatorowych jest przyczyną małych różnic w poziomach ich transkryptu pomiędzy grupą komórek CD4+CD25⁻ oraz CD4+CD25⁺. Jednakże występujące różnice mogą wynikać z obecności w grupie komórek CD4+CD25⁺ limfocytów T regulatorowych pozyskanych z wysięków nowotworowych, mogących wzmacniać aktywność limfocytów Treg poprzez silniejszą ekspresję receptora CD28. Ponadto, zaobserwowano znaczną korelację pomiędzy wzrostem transkryptu genu *CD28* i *CTLA-4*. Świadczy to, iż w Tregs obecnych w wysiękach opłucnowych stopień aktywacji był powiązany z prezentowanymi przez nie zdolnościami supresorowymi. Można podejrzewać, iż w przypadku limfocytów T efektorowych, gdzie receptory te pełnią funkcje antagonistyczne, powyższa korelacja miałaby charakter negatywny.

Natomiast znaczne różnice w poziomie transkryptu występowały pomiędzy komórkami CD4+CD25⁺ pozyskanymi z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i nienowotworowych. W literaturze brak wyników analogicznych porównań. Wszystkie przeprowadzone do tej pory badania poziomu transkryptu bądź ekspresji białka CD28 obejmowały całą populację limfocytów T krwi obwodowej lub limfocyty T naciekające tkanki objęte procesem nowotworzenia. Wang i wsp. zbadali poziom mRNA cząsteczki CD28 w różnych grupach wiekowych wśród pacjentów chorych na NDRP, sugerując wzrost ryzyka zachorowania wraz z wiekiem. Obserwowany był spadek poziomu transkryptu genu *CD28*, któremu towarzyszył wzrost poziomu transkryptu genu receptora apoptotycznego *CD95*. W tym badaniu poziom mRNA *CD28* obwodowych limfocytów był znacznie niższy wśród starszych pacjentów z NDRP w porównaniu do osób zdrowych w tym samym przedziale wiekowym oraz u osób starszych zdrowych w porównaniu z młodymi zdrowymi [236]. Zespół Pan'a otrzymał takie same wyniki na poziomie białka [237]. Generalnie, u pacjentów z NDRP występował spadek mRNA *CD28* i wzrost *CD95*, czyli spadała aktywacja komórek T a wzrastała ich apoptoza. Było to powiązane ze stopniem zaawansowania choroby, stopniem zróżnicowania komórek nowotworowych i obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Sugeruje to, że poziomy transkryptu *CD28* i *CD95* odgrywają istotną rolę w rozwoju raka płuca. Jako że badanie to objęło całkowitą populację limfocytów obwodowych, zaobserwowany spadek poziomu mRNA oraz białka CD28 był najprawdopodobniej powiązany z utratą aktywności przez

limfocyty T efektorowe, nie zaś regulatorowe, co szczególnie u osób starszych może prowadzić do osłabienia funkcji układu odpornościowego i rozprzestrzenienia komórek nowotworowych [236].

Obserwacje te potwierdził również na poziomie białka zespół Gruber'a analizując ekspresję receptora CD28 u pacjentek z rakiem piersi. Wykazał on jej spadek wśród obwodowych limfocytów T, szczególnie cytotoksycznych CD3+ i CD8+, przy jednoczesnym wzroście ekspresji receptora CD95 w stosunku do grupy kontrolnej [238].

Hoser i wsp. również wykazali podniesiony odsetek CD95+ limfocytów CD4+ i CD8+ we krwi obwodowej pacjentów z NDRP w porównaniu do osób zdrowych [239]. Według Walkera i wsp. [240] to właśnie sygnał płynący z sygnalizacji Fas-FasL prowadzi do szybkiego i znacznego spadku ekspresji receptora CD28 na limfocytach T i następującej apoptozy tych komórek.

Podobne wnioski wyciągnięto na podstawie badań przeprowadzonych na pacjentach z rakiem jelita grubego. Analizując poziom transkryptu genu *CD28*, Lee i wsp. wykazali jego istotny spadek wśród pacjentów nowotworowych w stosunku do osób zdrowych. Ponadto, zaobserwowali znacznie wyższy stosunek ekspresji mRNA genu *CD28* do *CTLA-4* w grupie pacjentów nowotworowych z zajęciem naczyń chłonnych w porównaniu do pacjentów wolnych od przerzutów, co w uzupełnieniu do analizy immunohistochemicznej, mogłoby stanowić narzędzie diagnozujące progresję raka [218].

Kosmaczewska i wsp., prowadząc badania na pacjentkach z rakiem szyjki macicy, potwierdzili te obserwacje na poziomie białka zauważając, że spadek ekspresji receptora CD28 dotyczył w szczególności komórki CD8+ [217].

Tak więc stwierdzony przez wielu badaczy spadek poziomu transkryptu genu *CD28* i jego białkowego produktu analizowany w całkowitej populacji limfocytów T dotyczył głównie limfocytów T efektorowych. Ewentualny wzrost poziomu transkryptu *CD28* w, stanowiącej mały procent całkowitej populacji komórek T, subpopulacji limfocytów T regulatorowych mógł nie wpływać znacząco na wynik. Dane te są zgodne z obecnym stanem wiedzy, wiążącym stany nowotworowe ze spadkiem aktywacji limfocytów T efektorowych i zniesieniem ich antynowotworowego wpływu [72,241]. Nie negują one jednak uzyskanych w przebiegu pracy doktorskiej wyników. Wyższy poziom transkryptu genu receptora CD28 w grupie nowotworowej świadczy o wyższym stopniu aktywacji komórek T regulatorowych w tym środowisku

w stosunku do nienowotworowego. Silna korelacja pomiędzy uzyskanym wzrostem poziomu transkryptu genu *CD28* i *CTLA-4* zdaje się potwierdzać powyższą hipotezę, świadcząc o związku aktywacji limfocytów Treg z ich wzmożonymi funkcjami supresorowymi. Dla odmiany, ta sama korelacja obserwowana w grupie nienowotworowej była słabsza, co mogło być spowodowane niższą aktywnością limfocytów Treg lub mniejszym ich odsetkiem w grupie komórek CD4+CD25+. W tym ostatnim przypadku poziom mRNA receptora CTLA-4, którego głównym źródłem są komórki CD4+CD25+FoxP3+ byłby niższy w stosunku do poziomu mRNA receptora CD28 występującego także na pozostałych komórkach CD4+CD25+.

Wiadomo, że GITR jest obecny na powierzchni limfocytów T regulatorowych oraz w mniejszym stopniu również na powierzchni naiwnych limfocytów T, gdzie jego ekspresja wzrasta po ich aktywacji [25]. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania poziomu transkryptu genu *GITR* potwierdziły obecny stan wiedzy, jako że poziom jego mRNA w komórkach CD4+CD25+ w stosunku do komórek CD4+CD25- był średnio 23-krotnie wyższy (mediana 8-krotnie). Ponadto, występowały istotne statystycznie korelacje pomiędzy wzrostem poziomu transkryptu genu *GITR* a wzrostem poziomu transkryptu genów *FOXP3* oraz *CTLA-4*, również powiązanych z subpopulacją limfocytów T regulatorowych, wskazując na znamiennej jej obecność wśród pozyskanych komórek CD4+CD25+. Podobnie jak w przypadku cząsteczki CTLA-4, obecność transkryptu genu *GITR* w grupie komórek CD4+CD25- może być spowodowana ich stanem aktywacji.

Wysoki poziom ekspresji GITR na powierzchni niestymulowanych limfocytów Treg sugeruje jego istotny udział w funkcjonowaniu tych komórek, jednakże jego rola budzi kontrowersje. Część badaczy opowiada się za teorią o stymulującym wpływie receptora GITR na proliferację i funkcje supresorowe limfocytów Treg. Liao i wsp. wykazali, iż oddziaływanie receptora GITR z jego ligandem – GITR-L, wybiórczo stymuluje ekspansję limfocytów Treg z zachowaniem ich funkcji supresorowych, zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*, co mogłoby być wykorzystane do wzbudzania tolerancji [105]. Podobne obserwacje zostały poczynione przez zespół van Olfen'a, który wykazał, że GITR jest molekułą stymulującą proliferację zarówno limfocytów T regulatorowych, jak i T efektorowych *in vivo* [108]. Levings z kolei pokazał, że stymulacja receptora GITR przeciwciałem monoklonalnym lub ligandem, mimo że nie aktywowała limfocytów Treg, nie znosiła również ich funkcji supresorowych [242]. Podkreślono jednak, że występują zasadnicze różnice w efekcie

jaki wywołuje stymulacja GITR-GITR-L pomiędzy ludzkim i mysim systemem odpornościowym, jako że ludzki GITR-L nie znosi supresorowych funkcji Tregs, w przeciwieństwie do mysiego [110].

W literaturze brak doniesień na temat pomiarów poziomu transkryptu genu *GITR* wśród pacjentów nowotworowych. Dostępne dotyczą głównie schorzeń o podłożu autoimmunologicznym. Zarówno Łuczyński i wsp. analizując limfocyty Treg u dzieci z cukrzycą typu I [243], jak i Ramirez i wsp. [244] analizując limfocyty T u pacjentów z wywołanymi infekcją wirusa HTLV-1 neurologicznymi zjawiskami autoimmunologicznymi, wykazali obniżony poziom mRNA genu *GITR* w stosunku do obejmującej osoby zdrowe grupy kontrolnej. Ponieważ u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi dochodzi do upośledzenia funkcji bądź spadku liczebności limfocytów T regulatorowych, niski poziom transkryptu genu *GITR* wydaje się być uzasadniony.

Natomiast uzyskane w przebiegu pracy doktorskiej wyniki badań prowadzonych na grupie pacjentów nowotworowych, wykazały wzrost poziomu transkryptu genu *GITR* w grupie komórek CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe w stosunku do nienowotworowych. Różnica ta jednakże nie była istotna statystycznie ze względu na szeroki zakres uzyskanych wyników. Niemniej jednak, wyższy poziom mRNA genu *GITR* u pacjentów nowotworowych, podobnie jak w przypadku pozostałych analizowanych genów, może świadczyć o większej aktywności inhibitorowej komórek Treg w mikrośrodowisku nowotworu lub, co pozostaje zgodne w wcześniejszych badaniach, o wyższym odsetku komórek Treg CD4+CD25+FoxP3+ wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych. W grupie nowotworowej korelacje pomiędzy wzrostem poziomu transkryptu genu *GITR* i wzrostem poziomu transkryptu genów *FOXP3* i *CTLA-4* były analogiczne do tych występujących w całej grupie komórek CD4+CD25+. Świadczy to prawdopodobnie o dużym udziale komórek z koekspresją czynnika transkrypcyjnego FoxP3 oraz receptorów CTLA-4 i GITR w grupie wysięków nowotworowych. Natomiast w grupie wysięków nienowotworowych nie stwierdzono powyższych korelacji. Wytłumaczeniem tej sytuacji wydaje się być niższy odsetek komórek CD4+CD25+FoxP3+ w grupie komórek CD4+CD25+. Zatem na skutek spadku liczebności komórek Treg poziom transkryptu genu *FOXP3* w grupie komórek CD4+CD25+ uległby znaczniejszemu obniżeniu niż poziom transkryptu genów *GITR* i *CTLA-4*, jako że obie cząsteczki mogą występować również na powierzchni

aktywowanych limfocytów T efektorowych, stanowiących pewien procent komórek CD4+CD25+. W związku z powyższym, zaskakujący jest brak korelacji pomiędzy poziomem mRNA genów *GITR* i *CTLA-4*.

Powyższa interpretacja wyników, oparta na teorii o pozytywnym wpływie oddziaływań GITR-GITR-L na supresorowe funkcje Tregs, wymaga potwierdzenia na poziomie białka. Przemawia za nią również spostrzeżenie Baltz i wsp., iż GITR-L jest obecny na powierzchni większości komórek linii nowotworowych, w tym raka płuca [245]. Obserwację tę potwierdziły kolejno analizy przeprowadzone na nowotworach okrężnicy, odbytu i żołądka z zastosowaniem cytometrii przepływowej, qRT-PCR oraz technik immunohistochemicznych. Zatem współwystępowanie limfocytów Treg i komórek nowotworowych w mikrośrodkowisku nowotworu sprzyjałoby oddziaływaniom GITR na powierzchni limfocytów Treg z GITR-L na powierzchni komórek nowotworowych i tym samym wzmocnieniu supresorowych właściwości Tregs. Ponadto, obecność GITR-L na powierzchni komórek nowotworowych powiązано ze wzrostem produkcji cytokiny immunosupresyjnej TGF- β przez te komórki [245], co mogłoby dalej prowadzić do ekspansji Tregs. W ten sposób mikrośrodkowisko nowotworu mogłoby osłabiać antynowotworową odpowiedź układu immunologicznego. Jednakże Cho i wsp., powiązali obecność GITR-L na powierzchni komórek nowotworowych ze wzrostem infiltracji limfocytów T CD8+ w mikrośrodkowisku nowotworu [246], co świadczyłoby, iż oddziaływania GITR-L na powierzchni komórek nowotworowych z receptorem GITR na powierzchni aktywowanych limfocytów T CD8+ sprzyja ich proliferacji i wzrostowi oporności na supresję ze strony Tregs [107,109,247,248], przyczyniając się tym samym do wzmocnienia odpowiedzi antynowotworowej.

W przeciwieństwie do przytoczonych powyżej danych stoją liczne doniesienia, mówiące o negatywnym wpływie receptora GITR na zdolności supresorowe Tregs [25,106,248-251]. Wskazują na to obserwacje pokazujące, iż stymulacja receptora GITR znosi funkcje supresorowe Tregs względem limfocytów CD4+CD25- *in vitro* oraz tolerancję immunologiczną względem komórek rakowych *in vivo* [25,106,107,109,247,252]. Dowiedziono tego w eksperymentach opartych na hodowli komórek T regulatorowych, T efektorowych oraz prezentujących antygen, w których dodatek przeciwciała anti-GITR (DTA-1) lub rozpuszczalnego GITR-L obniżał supresorowe funkcje Tregs [25,106,253]. Ten sam efekt został zaobserwowany przez zespół [107] po zastosowaniu linii komórkowej z ekspresją GITR-L. Zatem obecność

komórek T GITR+ chroni przed zjawiskami autoimmunologicznymi, podczas gdy stymulacja GITR prowadzi do IBD [253] a w mysim modelu transplantacyjnym do ostrego odrzutu przeszczepu [254]. Również Kim i wsp. uważają, iż ekspresja GITR-L na powierzchni APC tydzień po przeszczepie skóry jest przyczyną inaktywacji Tregs i odrzutu przeszczepu [251].

Badania *ex vivo* wykazały zróżnicowany poziom ekspresji receptora GITR na powierzchni limfocytów T w zależności od stadium choroby. Podwyższony poziom ekspresji GITR na powierzchni komórek CD4+CD25+ u pacjentów z ziarniniakiem Wegenera korelował z aktywnością choroby [255]. Natomiast obserwowany w toczeniu rumieniowatym układowym podwyższony poziom ekspresji GITR u pacjentów z aktywną postacią choroby w stosunku do formy nieaktywnej, może świadczyć o wzmożonej aktywacji komórek T efektorowych i ich niewrażliwości na supresorowy wpływ Tregs [256]. Podobnie, w efekcie stymulacji receptora GITR na powierzchni CD4+ komórek T u nosicieli wirusa HIV, produkcją one więcej TNF- α oraz INF- γ oraz wzrasta ich oporność na apoptozę [257].

Nie zostało jednak jednoznacznie określone, czy przełamanie tolerancji immunologicznej będące efektem sygnalizacji GITR-GITR-L jest spowodowane upośledzeniem funkcji supresorowych Tregs [25], stymulacją oraz ucieczką limfocytów T efektorowych spod kontroli Tregs [107], czy też kombinacją obu tych zjawisk [109,258,259]. Najbardziej prawdopodobny wydaje się zatem wariant mówiący, iż ekspresja GITR oraz GITR-L oraz jej wpływ na aktywność limfocytów T zależy od stadium aktywacji komórek oraz fazy odpowiedzi immunologicznej. Tak więc, interakcja GITR-GITR-L na wczesnym etapie odpowiedzi immunologicznej przyczyniałaby się do aktywacji limfocytów T efektorowych a na późniejszych do jej wygaszania poprzez stymulowanie supresorowych funkcji Tregs względem limfocytów T efektorowych [258].

Przeprowadzone w przebiegu obecnej pracy pomiary poziomu transkryptu genów *FOXP3*, *CD28*, *CTLA-4* oraz *GITR*, były pierwszymi przeprowadzonymi na nowotworowych i nienowotworowych wysiękach opłucnowych. Uzupełniają one obecny stan wiedzy o lepsze zrozumienie mechanizmów aktywacji Tregs indukowanej przez mikrośrodowisko nowotworu i ich wpływu na odpowiedź antynowotworową. Może to stanowić istotny kierunek rozwoju innowacyjnych immunoterapii nowotworów. Nadrzędnym celem jest określenie procedur selektywnie przełamujących tolerowanie guza z udziałem Tregs, bez eliminacji tolerancji na własne antygeny.

Charakterystyczne dla Tregs cząsteczki FoxP3, CTLA-4 oraz GITR, w powiązaniu z pełnionymi przez Tregs funkcjami supresorowymi są potencjalnym celem takich terapii, bez względu na fakt, czy inhibicja wymienionych cząsteczek prowadzi do obniżenia aktywności Tregs, czy też wzrostu aktywności limfocytów T efektorowych oraz ich oporności na inhibicję. Uzasadnione wydaje się łączenie podejść przełamujących supresję Tregs i tolerancję nowotworu, pamiętając, że skuteczność tych terapii jest zależna od wielu czynników, tj. rodzaju i agresywności nowotworu, czasu aplikacji, warunków panujących w mikrośrodowisku nowotworu, fazy odpowiedzi immunologicznej czy rodzaju modelu (ludzki, mysz) [260].

WNIOSKI

1. Mikrośrodowisko nowotworowego wysięku opłucnowego ogranicza wydolność układu odpornościowego na drodze kreowania populacji komórek T regulatorowych
2. Nie udało się wykazać udziału TGF- β w tym procesie
3. Wyższy względny poziom transkryptu genów cząsteczek warunkujących funkcje komórek T regulatorowych w nowotworowych wysiękach opłucnowych w stosunku do nienowotworowych świadczy o nasileniu właściwości supresorowych tych komórek w mikrośrodowisku nowotworu.

SPIS TABEL I RYCIN

- Tab. 1. Zestawienie przebadanych wysięków.
- Tab. 2. Charakterystyka przeciwciał użytych do oceny cytometrycznej komórek T regulatorowych CD4+CD25+FoxP3+.
- Tab. 3. Szczegółowy skład zestawu Human Treg Flow™ Kit (FOXP3 Alexa Fluor® 488/CD4 PE-Cy5/CD25 PE), (320401, BioLegend®, USA).
- Tab. 4. Odczynniki nie zawarte w zestawie Human Treg Flow™ Kit (FOXP3 Alexa Fluor® 488/CD4 PE-Cy5/CD25 PE, BioLegend®, USA).
- Tab. 5. Szczegółowy skład zestawu Quantikine® Human TGF-β1 (DB100B, R&D Systems®, USA).
- Tab. 6. Odczynniki niezawarte w zestawie Quantikine® Human TGF-β1 (R&D Systems®, USA).
- Tab. 7. Szczegółowy skład zestawu CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit, human (130-091-301, Miltenyi Biotec, Niemcy).
- Tab. 8. Odczynniki niezawarte w zestawie CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotec, Niemcy).
- Tab. 9. Skład zestawu TRIzol® Plus RNA Purification System (12183555, Life Technologies, USA).
- Tab. 10. Odczynniki niezawarte w zestawie TRIzol® Plus RNA Purification System (Life Technologies, USA).
- Tab. 11. Skład zestawu Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (04896866001, Roche Diagnostics, Niemcy).
- Tab. 12. Skład zestawu Light Cycler 480® Probes Master (04707494001, Roche Diagnostics, Niemcy).
- Tab. 13. Odczynniki niezawarte w zestawie Light Cycler 480® Probes Master (Roche Diagnostics, Niemcy).
- Tab. 14. Wartości współczynnika korelacji Spearmana określające zależności pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu poszczególnych genów wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.

- Tab. 15. Wartości współczynnika korelacji Spearmana określające zależności pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu poszczególnych genów wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.
- Tab. 16. Wartości współczynnika korelacji Spearmana określające zależności pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu poszczególnych genów wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.
- Ryc. 1. Obraz immunofenotypowy komórek wysięku opłucnowego.
- Ryc. 2. Schemat różnicowania komórek CD4+ w główne subpopulacje limfocytów T regulatorowych oraz limfocyty T efektorowe.
- Ryc. 3. Przebieg supresji limfocytów T efektorowych na drodze oddziaływań CTLA-4/B7.
- Ryc. 4. Obraz cytologiczny jednego z badanych nowotworowych wysięków opłucnowych.
- Ryc. 5. Przykład oceny odsetka komórek T regulatorowych wśród limfocytów wysięku opłucnowego.
- Ryc. 6. Ocena produktu izolacji komórek CD4+CD25+. A, B – *ex vivo*; C, D – po izolacji.
- Ryc. 7. Obraz reakcji Real-Time PCR, krzywe reakcji amplifikacji genu *CD28* wraz z kontrolą negatywną reakcji (H₂O).
- Ryc. 8. Porównanie odsetka limfocytów Treg pomiędzy grupami wysięków opłucnowych.
- Ryc. 9. Porównanie stężeń TGF-β1 pomiędzy grupami wysięków opłucnowych.
- Ryc. 10. Względny poziom transkryptu genów *FOXP3*, *CD28*, *GITR* oraz *CTLA-4* w grupie komórek CD4+CD25+ w stosunku do grupy komórek CD4+CD25-.
- Ryc. 11. Względny poziom transkryptu genu *FOXP3* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i wysięków nienowotworowych.
- Ryc. 12. Względny poziom transkryptu genu *CTLA-4* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i wysięków nienowotworowych.

- Ryc. 13. Poziom transkryptu genu *CD28* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i wysięków nienowotworowych.
- Ryc. 14. Względny poziom transkryptu genu *GITR* w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wysięków nowotworowych zawierających komórki nowotworowe i wysięków nienowotworowych.
- Ryc. 15. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CD28* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.
- Ryc. 16. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.
- Ryc. 17. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.
- Ryc. 18. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.
- Ryc. 19. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.
- Ryc. 20. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *GITR* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych ze wszystkich wysięków opłucnowych.
- Ryc. 21. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CD28* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.
- Ryc. 22. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.
- Ryc. 23. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych

- z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.
- Ryc. 24. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.
- Ryc. 25. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.
- Ryc. 26. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *GITR* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wysięków opłucnowych zawierających komórki nowotworowe.
- Ryc. 27. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CD28* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.
- Ryc. 28. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.
- Ryc. 29. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *FOXP3* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.
- Ryc. 30. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *GITR* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.
- Ryc. 31. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *CD28* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.
- Ryc. 32. Korelacja pomiędzy wzrostem względnego poziomu transkryptu genu *GITR* i *CTLA-4* wśród komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nienowotworowych wysięków opłucnowych.

PIŚMIENICTWO

1. Krenke R: Fizjologia i patofizjologia opłucnej. Warszawa, PZWL, 1997.
2. Noppen M, De Waele M, Li R, Gucht KV, D'Haese J, Gerlo E, Vincken W: Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000;162:1023-1026.
3. Broaddus VC, Araya M, Carlton DP, Bland RD: Developmental changes in pleural liquid protein concentration in sheep. *The American review of respiratory disease* 1991;143:38-41.
4. Kinasewitz GT: Transudative effusions. *Eur Respir J* 1997;10:714-718.
5. Yetkin O, Tek I, Kaya A, Ciledag A, Numanoglu N: A simple laboratory measurement for discrimination of transudative and exudative pleural effusion: Pleural viscosity. *Respiratory medicine* 2006;100:1286-1290.
6. Domagała-Kulawik J: Diagnostyka patomorfologiczna chorób opłucnej.; in Droszcz W (ed *Choroby opłucnej*. Warszawa, PZWL 1997, pp 66-78.
7. Shuey K, Payne Y: Malignant pleural effusion. *Clinical journal of oncology nursing* 2005;9:529-532.
8. Gjomarkaj M, Pace E, Melis M, Spatafora M, Toews GB: Mononuclear cells in exudative malignant pleural effusions. Characterization of pleural phagocytic cells. *Chest* 1994;106:1042-1049.
9. Antony VB: Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J* 2003;21:539-544.
10. Nguyen GK: Cytopathology of pleural mesotheliomas. *American journal of clinical pathology* 2000;114 Suppl:S68-81.
11. Pereira TC, Saad RS, Liu Y, Silverman JF: The diagnosis of malignancy in effusion cytology: A pattern recognition approach. *Advances in anatomic pathology* 2006;13:174-184.
12. Chung CL, Chen CH, Sheu JR, Chen YC, Chang SC: Proinflammatory cytokines, transforming growth factor-beta1, and fibrinolytic enzymes in loculated and free-flowing pleural exudates. *Chest* 2005;128:690-697.
13. Sikora JJ, Dworacki GT, Kaczmarek MT, Jenek RE, Zeromski JO: Immunosuppressive mechanisms in the microenvironment of malignant pleural effusions. *Cancer detection and prevention* 2004;28:325-330.

14. Sahn SA: Malignancy metastatic to the pleura. *Clinics in chest medicine* 1998;19:351-361.
15. Das DK: Serous effusions in malignant lymphomas: A review. *Diagnostic cytopathology* 2006;34:335-347.
16. Rodriguez JN, Pereira A, Martinez JC, Conde J, Pujol E: Pleural effusion in multiple myeloma. *Chest* 1994;105:622-624.
17. Light RW: Management of pleural effusions. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi* 2000;99:523-531.
18. Kassis J, Klominek J, Kohn EC: Tumor microenvironment: What can effusions teach us? *Diagnostic cytopathology* 2005;33:316-319.
19. Chorąży-Massalska M, Kontny E, Maśliński W: Naturalne komórki regulatorowe (cd4+cd25+). *Postępy Biologii Komórki* 2006;33:71-80.
20. Wan YY, Flavell RA: Tgf-beta and regulatory t cell in immunity and autoimmunity. *Journal of clinical immunology* 2008;28:647-659.
21. Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA: The number of human peripheral blood cd4+ cd25high regulatory t cells increases with age. *Clinical and experimental immunology* 2005;140:540-546.
22. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H: Inducing and expanding regulatory t cell populations by foreign antigen. *Nature immunology* 2005;6:1219-1227.
23. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA: Cd4+cd25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-1253.
24. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G: Ex vivo isolation and characterization of cd4(+)/cd25(+) t cells with regulatory properties from human blood. *The Journal of experimental medicine* 2001;193:1303-1310.
25. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S: Stimulation of cd25(+)/cd4(+) regulatory t cells through gitr breaks immunological self-tolerance. *Nature immunology* 2002;3:135-142.
26. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W: Neuropilin-1: A surface marker of regulatory t cells. *European journal of immunology* 2004;34:623-630.
27. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory t cell development by the transcription factor foxp3. *Science New York, NY* 2003;299:1057-1061.

28. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of cd4+cd25+ regulatory t cells. *Nature immunology* 2003;4:330-336.
29. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA: Role of lag-3 in regulatory t cells. *Immunity* 2004;21:503-513.
30. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA: Cd127 expression inversely correlates with foxp3 and suppressive function of human cd4+ t reg cells. *The Journal of experimental medicine* 2006;203:1701-1711.
31. Fehervari Z, Sakaguchi S: A paragon of self-tolerance: Cd25+cd4+ regulatory t cells and the control of immune responses. *Arthritis research & therapy* 2004;6:19-25.
32. D'Ambrosio D, Sinigaglia F, Adorini L: Special attractions for suppressor t cells. *Trends in immunology* 2003;24:122-126.
33. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J: Regulatory t cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 2003;197:403-411.
34. Choraży-Massalska M, Kontny E, Maśliński W: Kontrola odpowiedzi immunologicznej przez naturalne (cd4+cd25+) komórki regulatorowe. *Postępy Biologii Komórki* 2006;33:771-789.
35. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM: Activated cd4+cd25+ t cells selectively kill b lymphocytes. *Blood* 2006;107:3925-3932.
36. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH: Cutting edge: Direct suppression of b cells by cd4+ cd25+ regulatory t cells. *J Immunol* 2005;175:4180-4183.
37. Ramsdell F, Ziegler SF: Transcription factors in autoimmunity. *Current opinion in immunology* 2003;15:718-724.
38. Thompson C, Powrie F: Regulatory t cells. *Current opinion in pharmacology* 2004;4:408-414.
39. Roncarolo MG, Gregori S: Is foxp3 a bona fide marker for human regulatory t cells? *European journal of immunology* 2008;38:925-927.
40. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE: Transient expression of foxp3 in human activated nonregulatory cd4+ t cells. *European journal of immunology* 2007;37:129-138.

41. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL: Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of foxp3-positive regulatory t cells by th3 cells derived from tgf-beta t cell-transgenic mice. *J Immunol* 2007;178:179-185.
42. Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL: Th3 cells in peripheral tolerance. II. Tgf-beta-transgenic th3 cells rescue il-2-deficient mice from autoimmunity. *J Immunol* 2007;178:172-178.
43. Wang RF: Functional control of regulatory t cells and cancer immunotherapy. *Seminars in cancer biology* 2006;16:106-114.
44. Haribhai D, Lin W, Relland LM, Truong N, Williams CB, Chatila TA: Regulatory t cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol* 2007;178:2961-2972.
45. Chen W, Zhou D, Torrealba JR, Waddell TK, Grant D, Zhang L: Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory t cells. *J Immunol* 2005;175:3409-3416.
46. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M, Kunz-Schughart L, Schmidt CA, Andreesen R, Mackensen A: Isolation and characterization of human antigen-specific tcr alpha beta+ cd4(-)cd8(-) double-negative regulatory t cells. *Blood* 2005;105:2828-2835.
47. Wang RF: Immune suppression by tumor-specific cd4+ regulatory t-cells in cancer. *Seminars in cancer biology* 2006;16:73-79.
48. Peng G, Wang HY, Peng W, Kiniwa Y, Seo KH, Wang RF: Tumor-infiltrating gammadelta t cells suppress t and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity* 2007;27:334-348.
49. Gajewski TF: The expanding universe of regulatory t cell subsets in cancer. *Immunity* 2007;27:185-187.
50. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ: Cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector cd4+ t cells. *Nature immunology* 2007;8:1353-1362.
51. Salomon B, Bluestone JA: Complexities of cd28/b7: Ctla-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annual review of immunology* 2001;19:225-252.

52. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F: An essential role for scurf in cd4+cd25+ t regulatory cells. *Nature immunology* 2003;4:337-342.
53. Walker MR, Kasproicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF: Induction of foxp3 and acquisition of t regulatory activity by stimulated human cd4+cd25- t cells. *The Journal of clinical investigation* 2003;112:1437-1443.
54. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M: Foxp3 interacts with nuclear factor of activated t cells and nf-kappa b to repress cytokine gene expression and effector functions of t helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:5138-5143.
55. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR, Jr., Muller W, Rudensky AY: Regulatory t cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008;28:546-558.
56. Di Caro V, D'Anneo A, Phillips B, Engman C, Harnaha J, Lakomy R, Styche A, Trucco M, Giannoukakis N: Interleukin-7 matures suppressive cd127(+) forkhead box p3 (foxp3)(+) t cells into cd127(-) cd25(high) foxp3(+) regulatory t cells. *Clinical and experimental immunology* 2011;165:60-76.
57. Pandiyan P, Zheng L, Lenardo MJ: The molecular mechanisms of regulatory t cell immunosuppression. *Frontiers in immunology* 2011;2:60.
58. Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea JJ, Shevach EM: Cd4+ foxp3+ regulatory t cells confer infectious tolerance in a tgf-beta dependent manner. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:1975-1981.
59. Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, Dipaolo RA, Andersson J: Role of tgf-beta in the induction of foxp3 expression and t regulatory cell function. *Journal of clinical immunology* 2008;28:640-646.
60. Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA: Tgf-beta regulates in vivo expansion of foxp3-expressing cd4+cd25+ regulatory t cells responsible for protection against diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:4572-4577.
61. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, Waldmann H: Induction of foxp3+ regulatory t cells in the periphery of t cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004;172:6003-6010.

62. Nakamura K, Kitani A, Strober W: Cell contact-dependent immunosuppression by cd4(+)cd25(+) regulatory t cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* 2001;194:629-644.
63. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM: Cd4(+)cd25(+) regulatory t cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *The Journal of experimental medicine* 2002;196:237-246.
64. Li B, Greene MI: Special regulatory t-cell review: Foxp3 biochemistry in regulatory t cells--how diverse signals regulate suppression. *Immunology* 2008;123:17-19.
65. Apostolou I, Verginis P, Kretschmer K, Polansky J, Huhn J, von Boehmer H: Peripherally induced treg: Mode, stability, and role in specific tolerance. *Journal of clinical immunology* 2008;28:619-624.
66. Wuest TY, Willette-Brown J, Durum SK, Hurwitz AA: The influence of il-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory t cells. *Journal of leukocyte biology* 2008;84:973-980.
67. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA: Il-2 receptor beta dependent stat5 activation is required for the development of foxp3+ regulatory t cells. *J Immunol* 2007;178:280-290.
68. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Tchorzewski H: [cd4+cd25+ t regulatory cells: Their physiology and role in modulating immune response]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)* 2005;59:362-370.
69. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM: Cd86 and cd80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory t cells. *J Immunol* 2004;172:2778-2784.
70. von Boehmer H: Mechanisms of suppression by suppressor t cells. *Nature immunology* 2005;6:338-344.
71. Zou W: Regulatory t cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews* 2006;6:295-307.
72. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K: Regulatory t cells suppress tumor-specific cd8 t cell cytotoxicity through tgf-beta signals in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:419-424.

73. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA: The development and function of regulatory t cells. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2603-2622.
74. You S, Alyanakian MA, Segovia B, Damotte D, Bluestone J, Bach JF, Chatenoud L: Immunoregulatory pathways controlling progression of autoimmunity in nod mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1150:300-310.
75. You S, Leforban B, Garcia C, Bach JF, Bluestone JA, Chatenoud L: Adaptive tgf-beta-dependent regulatory t cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-cd3 antibody treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:6335-6340.
76. Yamaguchi T, Sakaguchi S: Regulatory t cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Seminars in cancer biology* 2006;16:115-123.
77. Loser K, Apelt J, Voskort M, Mohaupt M, Balkow S, Schwarz T, Grabbe S, Beissert S: Il-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J Immunol* 2007;179:365-371.
78. Gil-Guerrero L, Dotor J, Huibregtse IL, Casares N, Lopez-Vazquez AB, Rudilla F, Riezu-Boj JI, Lopez-Sagaseta J, Hermida J, Van Deventer S, Bezunartea J, Llopiz D, Sarobe P, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ: In vitro and in vivo down-regulation of regulatory t cell activity with a peptide inhibitor of tgf-beta1. *J Immunol* 2008;181:126-135.
79. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L: Cd4+cd25+ regulatory t cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine* 2005;202:1075-1085.
80. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL: A unique subset of cd4+cd25highfoxp3+ t cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2007;13:4345-4354.
81. Duvic M, Talpur R: Optimizing denileukin diftitox (ontak) therapy. *Future oncology (London, England)* 2008;4:457-469.

82. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Hermine A, Devergne O: Human cd4+ cd25+ foxp3+ regulatory t cells do not constitutively express il-35. *J Immunol* 2008;181:6898-6905.
83. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA: The inhibitory cytokine il-35 contributes to regulatory t-cell function. *Nature* 2007;450:566-569.
84. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ: Cytotoxic lymphocytes require granzyme b for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994;76:977-987.
85. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ: Granzyme b and perforin are important for regulatory t cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007;27:635-646.
86. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL: Human circulating cd4+cd25highfoxp3+ regulatory t cells kill autologous cd8+ but not cd4+ responder cells by fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 2009;182:1469-1480.
87. Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y: Involvement of cellular death in trail/dr5-dependent suppression induced by cd4(+)/cd25(+) regulatory t cells. *Cell death and differentiation* 2007;14:2076-2084.
88. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M: Regulatory t cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133:775-787.
89. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A: Interleukin-2 is essential for cd4+cd25+ regulatory t cell function. *European journal of immunology* 2004;34:2480-2488.
90. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, Murrack P: Activated t cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 2002;16:759-767.
91. Lenardo MJ: Interleukin-2 programs mouse alpha beta t lymphocytes for apoptosis. *Nature* 1991;353:858-861.
92. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ, Dustin ML: Regulatory t cells inhibit stable contacts between cd4+ t cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2006;203:505-511.
93. Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, Santamaria P, Locksley RM, Krummel MF, Bluestone JA: Visualizing regulatory t cell control of

- autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nature immunology* 2006;7:83-92.
94. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S: Ctl4 control over foxp3+ regulatory t cell function. *Science New York, NY* 2008;322:271-275.
 95. Sansom DM, Walker LS: The role of cd28 and cytotoxic t-lymphocyte antigen-4 (ctla-4) in regulatory t-cell biology. *Immunological reviews* 2006;212:131-148.
 96. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, Chung HT: Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses t cell proliferation via inhibition of il-2 production. *J Immunol* 2004;172:4744-4751.
 97. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH: Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:2570-2582.
 98. Rudd CE: Ctl4 co-receptor impacts on the function of treg and cd8+ t-cell subsets. *European journal of immunology* 2009;39:687-690.
 99. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM: Trans-endocytosis of cd80 and cd86: A molecular basis for the cell-extrinsic function of ctla-4. *Science New York, NY* 2011;332:600-603.
 100. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ: How regulatory t cells work. *Nature reviews* 2008;8:523-532.
 101. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E: Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory t cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:1303-1310.
 102. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB: T-cell regulation by cd28 and ctla-4. *Nature reviews* 2001;1:220-228.
 103. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in ctla-4. *Science New York, NY* 1995;270:985-988.
 104. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F: Cytotoxic t lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules

- on dendritic cells in cd4+ cd25+ regulatory t-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006;118:240-249.
105. Liao G, Nayak S, Rugeiro JR, Berger SB, Detre C, Romero X, de Waal Malefyt R, Chatila TA, Herzog RW, Terhorst C: Gitr engagement preferentially enhances proliferation of functionally competent cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells. *International immunology* 2010;22:259-270.
106. Ji HB, Liao G, Faubion WA, Abadia-Molina AC, Cozzo C, Laroux FS, Caton A, Terhorst C: Cutting edge: The natural ligand for glucocorticoid-induced tnf receptor-related protein abrogates regulatory t cell suppression. *J Immunol* 2004;172:5823-5827.
107. Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenberg D, Carreno BM, Collins M, Shevach EM: Engagement of glucocorticoid-induced tnfr family-related receptor on effector t cells by its ligand mediates resistance to suppression by cd4+cd25+ t cells. *J Immunol* 2004;173:5008-5020.
108. van Olfen RW, Koning N, van Gisbergen KP, Wensveen FM, Hoek RM, Boon L, Hamann J, van Lier RA, Nolte MA: Gitr triggering induces expansion of both effector and regulatory cd4+ t cells in vivo. *J Immunol* 2009;182:7490-7500.
109. Ronchetti S, Nocentini G, Riccardi C, Pandolfi PP: Role of gitr in activation response of t lymphocytes. *Blood* 2002;100:350-352.
110. Tuyaeerts S, Van Meirvenne S, Bonehill A, Heirman C, Corthals J, Waldmann H, Breckpot K, Thielemans K, Aerts JL: Expression of human gitrl on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of cd4+cd25+ regulatory t cells. *Journal of leukocyte biology* 2007;82:93-105.
111. Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarlı A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, Palmer DC, Chan CC, Klebanoff CA, Overwijk WW, Rosenberg SA, Restifo NP: Cd8+ t cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by cd4+ t helper cells and hindered by naturally occurring t regulatory cells. *J Immunol* 2005;174:2591-2601.
112. Curiel TJ: Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:1167-1174.
113. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K: Intraepithelial cd8+ tumor-infiltrating

- lymphocytes and a high cd8+/regulatory t cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:18538-18543.
114. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM: Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology* 2007;25:267-296.
 115. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H: Ccl17 and ccl22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of foxp3+ regulatory t cells in gastric cancer. *International journal of cancer* 2008;122:2286-2293.
 116. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menetrier-Caux C: Regulatory t cells recruited through ccl22/ccr4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer research* 2009;69:2000-2009.
 117. Zhou G, Drake CG, Levitsky HI: Amplification of tumor-specific regulatory t cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood* 2006;107:628-636.
 118. Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY: An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory t cell receptor repertoires. *Nature immunology* 2006;7:401-410.
 119. Jaeckel E, von Boehmer H, Manns MP: Antigen-specific foxp3-transduced t-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:306-310.
 120. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY: A function for interleukin 2 in foxp3-expressing regulatory t cells. *Nature immunology* 2005;6:1142-1151.
 121. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, Vegoe AL, Hsieh CS, Jenkins MK, Farrar MA: Linked t cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory t cell repertoire. *Immunity* 2008;28:112-121.
 122. Lio CW, Hsieh CS: A two-step process for thymic regulatory t cell development. *Immunity* 2008;28:100-111.
 123. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L: Tumor cells convert immature myeloid

- dendritic cells into tgf-beta-secreting cells inducing cd4+cd25+ regulatory t cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* 2005;202:919-929.
124. Fritzsching B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, Krammer PH, Suri-Payer E: In contrast to effector t cells, cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells are highly susceptible to cd95 ligand- but not to tcr-mediated cell death. *J Immunol* 2005;175:32-36.
 125. Dougan M, Dranoff G: Immune therapy for cancer. *Annual review of immunology* 2009;27:83-117.
 126. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang A, Dahm P, Chao N, Gilboa E, Vieweg J: Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory t cells. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:3623-3633.
 127. Weber J: Overcoming immunologic tolerance to melanoma: Targeting ctla-4 with ipilimumab (mdx-010). *The oncologist* 2008;13 Suppl 4:16-25.
 128. Tang Q, Bluestone JA: The foxp3+ regulatory t cell: A jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology* 2008;9:239-244.
 129. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT: The new lung cancer staging system. *Chest* 2009;136:260-271.
 130. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 1987;162:156-159.
 131. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B: Increase of regulatory t cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:606-612.
 132. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC: Prevalence of regulatory t cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169:2756-2761.
 133. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ: Synergism of cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of cd25(+) regulatory t cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for

- suppression of autoreactive cytotoxic t lymphocyte responses. *The Journal of experimental medicine* 2001;194:823-832.
134. Pasare C, Medzhitov R: Toll pathway-dependent blockade of cd4+cd25+ t cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* New York, NY 2003;299:1033-1036.
 135. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S: Induction of tumor immunity by removing cd25+cd4+ t cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999;163:5211-5218.
 136. Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, Kaiser LR, June CH: Cutting edge: Regulatory t cells from lung cancer patients directly inhibit autologous t cell proliferation. *J Immunol* 2002;168:4272-4276.
 137. Kawaida H, Kono K, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Ooi A, Fujii H: Distribution of cd4+cd25high regulatory t-cells in tumor draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *The Journal of surgical research* 2005;124:151-157.
 138. Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochoy G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L: Foxp3 expressing cd4+cd25(high) regulatory t cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating t cells. *J Immunol* 2004;173:1444-1453.
 139. Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellstrom M, Egevad L, Pisa P: Cd4+cd25high t cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol* 2006;177:7398-7405.
 140. Mao C, Wang S, Jiang Q, Tong J, Ma J, Yang M, Xu X, Qiu G, Shao Q, Li L, Xu H: Increased cd4cd25+foxp3+ regulatory t cells in cancer patients from conversion of cd4+cd25- t cells through tumor-derived factors. *Onkologie* 2008;31:243-248.
 141. DeLong P, Carroll RG, Henry AC, Tanaka T, Ahmad S, Leibowitz MS, Serman DH, June CH, Albelda SM, Vonderheide RH: Regulatory t cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma. *Cancer biology & therapy* 2005;4:342-346.
 142. Wolf D, Rumpold H, Koppelstatter C, Gastl GA, Steurer M, Mayer G, Gunsilius E, Tilg H, Wolf AM: Telomere length of in vivo expanded cd4(+)+cd25 (+) regulatory t-cells is preserved in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:1198-1208.

143. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A: Cd4+cd25+ regulatory t cells in patients with gastrointestinal malignancies: Possible involvement of regulatory t cells in disease progression. *Cancer* 2003;98: 1089-1099.
144. Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S, Youn J: Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated cd4+cd25- t cells. *International immunology* 2004;16:1203-1213.
145. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM: Conversion of peripheral cd4+cd25- naive t cells to cd4+cd25+ regulatory t cells by tgf-beta induction of transcription factor foxp3. *The Journal of experimental medicine* 2003;198:1875-1886.
146. Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP: Tumor-induced expansion of regulatory t cells by conversion of cd4+cd25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer research* 2006;66:4488-4495.
147. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F: A functionally specialized population of mucosal cd103+ dcs induces foxp3+ regulatory t cells via a tgf-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:1757-1764.
148. You S, Thieblemont N, Alyanakian MA, Bach JF, Chatenoud L: Transforming growth factor-beta and t-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes. *Immunological reviews* 2006;212:185-202.
149. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM: Induction of foxp3 expression in naive human cd4+foxp3 t cells by t-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* 2007;110:2983-2990.
150. Horwitz DA, Zheng SG, Wang J, Gray JD: Critical role of il-2 and tgf-beta in generation, function and stabilization of foxp3+cd4+ treg. *European journal of immunology* 2008;38:912-915.
151. Cheng D, Lee YC, Rogers JT, Perkett EA, Moyers JP, Rodriguez RM, Light RW: Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor-beta isoform levels in pleural effusions. *Chest* 2000;118: 1747-1753.
152. Atanackovic D, Cao Y, Kim JW, Brandl S, Thom I, Faltz C, Hildebrandt Y, Bartels K, de Weerth A, Hegewisch-Becker S, Hossfeld DK, Bokemeyer C: The

- local cytokine and chemokine milieu within malignant effusions. *Tumour Biol* 2008;29:93-104.
153. Ceyhan BB, Demiralp E, Karakurt ZL, Karakurt S, Sungur M: Transforming growth factor beta-1 level in pleural effusion. *Respirology Carlton, Vic* 2003;8:321-325.
154. Maeda J, Ueki N, Ohkawa T, Iwahashi N, Nakano T, Hada T, Higashino K: Local production and localization of transforming growth factor-beta in tuberculous pleurisy. *Clinical and experimental immunology* 1993;92:32-38.
155. Duysinx BC, Corhay JL, Hubin L, Nguyen D, Henket M, Louis R: Diagnostic value of interleukine-6, transforming growth factor-beta 1 and vascular endothelial growth factor in malignant pleural effusions. *Respiratory medicine* 2008;102:1708-1714.
156. Maeda J, Ueki N, Ohkawa T, Iwahashi N, Nakano T, Hada T, Higashino K: Transforming growth factor-beta 1 (tgf-beta 1)- and beta 2-like activities in malignant pleural effusions caused by malignant mesothelioma or primary lung cancer. *Clinical and experimental immunology* 1994;98:319-322.
157. Fitzpatrick DR, Bielefeldt-Ohmann H, Himbeck RP, Jarnicki AG, Marzo AL, Robinson BW: Transforming growth factor-beta: Antisense rna-mediated inhibition affects anchorage-independent growth, tumorigenicity and tumor-infiltrating t-cells in malignant mesothelioma. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 1994;11:29-44.
158. Marzo AL, Fitzpatrick DR, Robinson BW, Scott B: Antisense oligonucleotides specific for transforming growth factor beta2 inhibit the growth of malignant mesothelioma both in vitro and in vivo. *Cancer research* 1997;57:3200-3207.
159. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J: Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory t cells. *PLoS biology* 2007;5:e38.
160. Huehn J, Polansky JK, Hamann A: Epigenetic control of foxp3 expression: The key to a stable regulatory t-cell lineage? *Nature reviews* 2009;9:83-89.
161. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J: DNA methylation controls foxp3 gene expression. *European journal of immunology* 2008;38:1654-1663.

162. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY: Role of conserved non-coding DNA elements in the *foxp3* gene in regulatory t-cell fate. *Nature* 2010;463:808-812.
163. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grutzkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Turbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J: DNA demethylation in the human *foxp3* locus discriminates regulatory t cells from activated *foxp3*(+) conventional t cells. *European journal of immunology* 2007;37:2378-2389.
164. Kim HP, Leonard WJ: Creb/atf-dependent t cell receptor-induced *foxp3* gene expression: A role for DNA methylation. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:1543-1551.
165. Schmidl C, Klug M, Boeld TJ, Andreesen R, Hoffmann P, Edinger M, Rehli M: Lineage-specific DNA methylation in t cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome research* 2009;19:1165-1174.
166. Beier UH, Akimova T, Liu Y, Wang L, Hancock WW: Histone/protein deacetylases control *foxp3* expression and the heat shock response of t-regulatory cells. *Current opinion in immunology* 2011;23:670-678.
167. Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, Reid SP, Levy DE, Bromberg JS: Epigenetic regulation of *foxp3* expression in regulatory t cells by DNA methylation. *J Immunol* 2009;182:259-273.
168. Ohkura N, Hamaguchi M, Sakaguchi S: *Foxp3*⁺ regulatory t cells: Control of *foxp3* expression by pharmacological agents. *Trends in pharmacological sciences* 2011;32:158-166.
169. Lal G, Bromberg JS: Epigenetic mechanisms of regulation of *foxp3* expression. *Blood* 2009;114:3727-3735.
170. Xu L, Kitani A, Strober W: Molecular mechanisms regulating *tgf-beta*-induced *foxp3* expression. *Mucosal immunology* 2010;3:230-238.
171. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M: *Smad3* and *nfat* cooperate to induce *foxp3* expression through its enhancer. *Nature immunology* 2008;9:194-202.
172. Samon JB, Champhekar A, Minter LM, Telfer JC, Miele L, Fauq A, Das P, Golde TE, Osborne BA: *Notch1* and *tgfbeta1* cooperatively regulate *foxp3* expression and the maintenance of peripheral regulatory t cells. *Blood* 2008;112:1813-1821.

173. Kim JD, Choi BK, Bae JS, Lee UH, Han IS, Lee HW, Youn BS, Vinay DS, Kwon BS: Cloning and characterization of gitr ligand. *Genes and immunity* 2003;4:564-569.
174. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome (ipex) is caused by mutations of foxp3. *Nature genetics* 2001;27:20-21.
175. Gambineri E, Perroni L, Passerini L, Bianchi L, Doglioni C, Meschi F, Bonfanti R, Sznajder Y, Tommasini A, Lawitschka A, Junker A, Dunstheimer D, Heidemann PH, Cazzola G, Cipolli M, Friedrich W, Janic D, Azzi N, Richmond E, Vignola S, Barabino A, Chiumello G, Azzari C, Roncarolo MG, Bacchetta R: Clinical and molecular profile of a new series of patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: Inconsistent correlation between forkhead box protein 3 expression and disease severity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008;122:1105-1112 e1101.
176. Campbell DJ, Ziegler SF: Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory t cells. *Nature reviews* 2007;7:305-310.
177. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC, Ziegler SF, Roncarolo MG, Levings MK: The role of 2 foxp3 isoforms in the generation of human cd4+ tregs. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:3276-3284.
178. Passerini L, Allan SE, Battaglia M, Di Nunzio S, Alstad AN, Levings MK, Roncarolo MG, Bacchetta R: Stat5-signaling cytokines regulate the expression of foxp3 in cd4+cd25+ regulatory t cells and cd4+cd25- effector t cells. *International immunology* 2008;20:421-431.
179. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, Barda AK, Gourgoulialis KI, Germenis AE: Foxp3 expression in human cancer cells. *Journal of translational medicine* 2008;6:19.
180. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grussel S, Sipos B, Grutzmann R, Pilarsky C, Ungefroren H, Saeger HD, Kloppel G, Kabelitz D, Kalthoff H: Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer research* 2007;67:8344-8350.

181. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Menard S, Tagliabue E, Balsari A: Foxp3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:1746-1752.
182. Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rebe C, Chalmin F, Vincent J, Bruchard M, Chauffert B, Martin F, Fumoleau P, Ghiringhelli F: Presence of foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in her2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast cancer research and treatment* 2011;125:65-72.
183. Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S, Russell SE, Kirkpatrick N, Gedye C, Moss D, Ng SP, MacGregor D, Davis ID, Cebon J, Chen W: The regulatory t cell-associated transcription factor foxp3 is expressed by tumor cells. *Cancer research* 2008;68:3001-3009.
184. Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, Okabe K, Matsumoto T, Sugi K, Ueoka H: Prognostic potential of foxp3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory t cells. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2012;75:95-101.
185. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY: Foxp3-dependent programme of regulatory t-cell differentiation. *Nature* 2007;445:771-775.
186. Zuo T, Liu R, Zhang H, Chang X, Liu Y, Wang L, Zheng P, Liu Y: Foxp3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene *skp2*. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:3765-3773.
187. Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, Liu Y, Wang Y, Liu X, Chan MW, Liu JQ, Love R, Liu CG, Godfrey V, Shen R, Huang TH, Yang T, Park BK, Wang CY, Zheng P, Liu Y: Foxp3 is an x-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the *her-2/erbb2* oncogene. *Cell* 2007;129:1275-1286.
188. Xu T, Duan Q, Wang G, Hu B: Cd4 + cd25high regulatory t cell numbers and foxp3 mRNA expression in patients with advanced esophageal cancer before and after chemotherapy. *Cell biochemistry and biophysics* 2011;61:389-392.
189. Needham DJ, Lee JX, Beilharz MW: Intra-tumoural regulatory t cells: A potential new target in cancer immunotherapy. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;343:684-691.

190. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T: Cd4+cd25+ regulatory t cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncology reports* 2005;14:1269-1273.
191. Yuan XL, Chen L, Li MX, Dong P, Xue J, Wang J, Zhang TT, Wang XA, Zhang FM, Ge HL, Shen LS, Xu D: Elevated expression of foxp3 in tumor-infiltrating treg cells suppresses t-cell proliferation and contributes to gastric cancer progression in a cox-2-dependent manner. *Clinical immunology Orlando, Fla* 2010;134:277-288.
192. Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F, Huang M, Batra RK, Dubinett SM: Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin e2-dependent promotion of foxp3 expression and cd4+ cd25+ t regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer research* 2005;65:5211-5220.
193. Matsuura K, Yamaguchi Y, Osaki A, Ohara M, Okita R, Emi A, Murakami S, Arihiro K: Foxp3 expression of micrometastasis-positive sentinel nodes in breast cancer patients. *Oncology reports* 2009;22:1181-1187.
194. Gupta S, Joshi K, Wig JD, Arora SK: Intratumoral foxp3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 2007;46:792-797.
195. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Deibl M, Gastl G, Gunsilius E, Marth C: The expression of the regulatory t cell-specific forkhead box transcription factor foxp3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:8326-8331.
196. Capriotti E, Vonderheid EC, Thoburn CJ, Wasik MA, Bahler DW, Hess AD: Expression of t-plastin, foxp3 and other tumor-associated markers by leukemic t-cells of cutaneous t-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 2008;49:1190-1201.
197. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J, Banham AH, Roncador G, Montalban C, Piris MA: Outcome in hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory t cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:1467-1473.
198. Seo SJ, Fields ML, Buckler JL, Reed AJ, Mandik-Nayak L, Nish SA, Noelle RJ, Turka LA, Finkelman FD, Caton AJ, Erikson J: The impact of t helper and t regulatory cells on the regulation of anti-double-stranded DNA b cells. *Immunity* 2002;16:535-546.

199. Janssens W, Carlier V, Wu B, VanderElst L, Jacquemin MG, Saint-Remy JM: Cd4+cd25+ t cells lyse antigen-presenting b cells by fas-fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol* 2003;171:4604-4612.
200. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S: Heterogeneity of natural foxp3+ t cells: A committed regulatory t-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:1903-1908.
201. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W: Cutting edge: Regulatory t cells induce cd4+cd25-foxp3- t cells or are self-induced to become th17 cells in the absence of exogenous tgf-beta. *J Immunol* 2007;178:6725-6729.
202. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C: Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory t cell programs. *Immunity* 2008;29:44-56.
203. Duarte JH, Zelenay S, Bergman ML, Martins AC, Demengeot J: Natural treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *European journal of immunology* 2009;39:948-955.
204. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S: Functional delineation and differentiation dynamics of human cd4+ t cells expressing the foxp3 transcription factor. *Immunity* 2009;30:899-911.
205. Hodge DR, Xiao W, Clausen PA, Heidecker G, Szyf M, Farrar WL: Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (hdmnt) gene in human erythroleukemia cells. *The journal of biological chemistry* 2001;276:39508-39511.
206. Hansmann L, Schmidl C, Kett J, Steger L, Andreesen R, Hoffmann P, Rehli M, Edinger M: Dominant th2 differentiation of human regulatory t cells upon loss of foxp3 expression. *J Immunol* 2012;188:1275-1282.
207. Hori S: Developmental plasticity of foxp3+ regulatory t cells. *Current opinion in immunology* 2010;22:575-582.
208. Zheng Y, Manzotti CN, Burke F, Dussably L, Qureshi O, Walker LS, Sansom DM: Acquisition of suppressive function by activated human cd4+ cd25- t cells

- is associated with the expression of ctla-4 not foxp3. *J Immunol* 2008;181:1683-1691.
209. Schmidt EM, Wang CJ, Ryan GA, Clough LE, Qureshi OS, Goodall M, Abbas AK, Sharpe AH, Sansom DM, Walker LS: Ctla-4 controls regulatory t cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *J Immunol* 2009;182:274-282.
 210. Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA: Tgf-beta requires ctla-4 early after t cell activation to induce foxp3 and generate adaptive cd4+cd25+ regulatory cells. *J Immunol* 2006;176:3321-3329.
 211. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A: Foxp3 controls regulatory t cell function through cooperation with nfat. *Cell* 2006;126:375-387.
 212. Li R, Perez N, Karumuthil-Meilethil S, Prabhakar BS, Holterman MJ, Vasu C: Enhanced engagement of ctla-4 induces antigen-specific cd4+cd25+foxp3+ and cd4+cd25- tgf-beta 1+ adaptive regulatory t cells. *J Immunol* 2007;179:5191-5203.
 213. Karman J, Jiang JL, Gumlaw N, Zhao H, Campos-Rivera J, Sancho J, Zhang J, Jiang C, Cheng SH, Zhu Y: Ligation of cytotoxic t lymphocyte antigen-4 to the tcr inhibits t cell activation and directs differentiation into foxp3+ regulatory t cells. *The Journal of biological chemistry* 2012 (Epub ahead of print).
 214. Jaberipour M, Habibagahi M, Hosseini A, Habibabad SR, Talei A, Ghaderi A: Increased ctla-4 and foxp3 transcripts in peripheral blood mononuclear cells of patients with breast cancer. *Pathol Oncol Res* 2010;16:547-551.
 215. Bi Y, Wei L, Mao HT, Zhang L, Zuo WS: [expressions of fas, ctla-4 and rhobtb2 genes in breast carcinoma and their relationship with clinicopathological factors]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* 2008;30:749-753.
 216. Ohara M, Yamaguchi Y, Matsuura K, Murakami S, Arihiro K, Okada M: Possible involvement of regulatory t cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:441-447.
 217. Kosmaczewska A, Bocko D, Ciszak L, Wlodarska-Polinska I, Kornafel J, Sztęblich A, Masternak A, Frydecka I: Dysregulated expression of both the costimulatory cd28 and inhibitory ctla-4 molecules in pb t cells of advanced

- cervical cancer patients suggests systemic immunosuppression related to disease progression. *Pathol Oncol Res* 2012;18:479-489.
218. Lee H, Kim JH, Yang SY, Kong J, Oh M, Jeong DH, Chung JI, Bae KB, Shin JY, Hong KH, Choi I: Peripheral blood gene expression of b7 and cd28 family members associated with tumor progression and microscopic lymphovascular invasion in colon cancer patients. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2010;136:1445-1452.
219. Loos M, Giese NA, Kleeff J, Giese T, Gaida MM, Bergmann F, Laschinger M, M WB, Friess H: Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule b7-h1 in pancreatic cancer. *Cancer letters* 2008;268:98-109.
220. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Chevillie JC, Kwon ED: Tumor b7-h1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer research* 2006;66:3381-3385.
221. Simon I, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, Massobrio M, Scorilas A, Kim NW, Sarno MJ, Wolfert RL, Diamandis EP: B7-h4 is over-expressed in early-stage ovarian cancer and is independent of ca125 expression. *Gynecologic oncology* 2007;106:334-341.
222. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, Mizuno T, Yoriki R, Kashizuka H, Yane K, Tsushima F, Otsuki N, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y: Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2947-2953.
223. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, Nakamura S, Enomoto K, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y: Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2151-2157.
224. Zheng H, Li Y, Wang X, Zhang X, Wang X: Expression and significance of gp96 and immune-related gene ctla-4, cd8 in lung cancer tissues. *Chinese journal of lung cancer* 2010;13:790-794.
225. Mao H, Zhang L, Yang Y, Zuo W, Bi Y, Gao W, Deng B, Sun J, Shao Q, Qu X: New insights of ctla-4 into its biological function in breast cancer. *Current cancer drug targets* 2010;10:728-736.

226. Joshi AD, Hegde GV, Dickinson JD, Mittal AK, Lynch JC, Eudy JD, Armitage JO, Bierman PJ, Bociek RG, Devetten MP, Vose JM, Joshi SS: Atm, ctla4, mnda, and hem1 in high versus low cd38 expressing b-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2007;13:5295-5304.
227. Salvi S, Fontana V, Boccardo S, Merlo DF, Margallo E, Laurent S, Morabito A, Rijavec E, Dal Bello MG, Mora M, Ratto GB, Grossi F, Truini M, Pistillo MP: Evaluation of ctla-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2012 (Epub ahead of print).
228. Zou W, Chen L: Inhibitory b7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature reviews* 2008;8:467-477.
229. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH: The b7 family revisited. *Annual review of immunology* 2005;23:515-548.
230. Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja MK, Yu XZ, Dong C: T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *The EMBO journal* 2006;25:2623-2633.
231. Sanchez-Lockhart M, Marin E, Graf B, Abe R, Harada Y, Sedwick CE, Miller J: Cutting edge: Cd28-mediated transcriptional and posttranscriptional regulation of il-2 expression are controlled through different signaling pathways. *J Immunol* 2004;173:7120-7124.
232. Foell J, Hewes B, Mittler RS: T cell costimulatory and inhibitory receptors as therapeutic targets for inducing anti-tumor immunity. *Current cancer drug targets* 2007;7:55-70.
233. Vallejo AN: Cd28 extinction in human t cells: Altered functions and the program of t-cell senescence. *Immunological reviews* 2005;205:158-169.
234. Mittrucker HW, Kursar M, Kohler A, Hurwitz R, Kaufmann SH: Role of cd28 for the generation and expansion of antigen-specific cd8(+) t lymphocytes during infection with listeria monocytogenes. *J Immunol* 2001;167:5620-5627.
235. Krinzman SJ, De Sanctis GT, Cernadas M, Mark D, Wang Y, Listman J, Kobzik L, Donovan C, Nassr K, Katona I, Christiani DC, Perkins DL, Finn PW: Inhibition of t cell costimulation abrogates airway hyperresponsiveness in a murine model. *The Journal of Clinical Investigation* 1996;98:2693-2699.
236. Wang L, Pan XD, Xie Y, Zhang GB, Jiang M, Zheng L, Wang JH, Shi JF, Zhang XG: Altered cd28 and cd95 mrna expression in peripheral blood

- mononuclear cells from elderly patients with primary non-small cell lung cancer. *Chinese medical journal* 2010;123:51-56.
237. Pan X, Wang L, Shi J, Zhang G, Zhang X: Expression and clinical significance of the membrane cd28 and the serum level of soluble cd28 in elderly patients with primary non-small cell lung cancer. *Chin J Geriatrics* 2009;28:445-448.
238. Gruber IV, El Yousfi S, Durr-Storzer S, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T: Down-regulation of cd28, tcr-zeta (zeta) and up-regulation of fas in peripheral cytotoxic t-cells of primary breast cancer patients. *Anticancer research* 2008;28:779-784.
239. Hoser G, Wasilewska D, Domagala-Kulawik J: Expression of fas receptor on peripheral blood lymphocytes from patients with non-small cell lung cancer. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 2004;42:249-252.
240. Walker LS, McLeod JD, Boulougouris G, Patel YI, Hall ND, Sansom DM: Down-regulation of cd28 via fas (cd95): Influence of cd28 on t-cell apoptosis. *Immunology* 1998;94:41-47.
241. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 2002;3:991-998.
242. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG: Human cd25+cd4+ t suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 t regulatory cells. *The Journal of experimental medicine* 2002;196:1335-1346.
243. Luczynski W, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Stasiak-Barmuta A, Urban R, Ilendo E, Urban M, Hryszko M, Kretowski A, Gorska M: Diminished expression of icos, gitr and ctla-4 at the mrna level in t regulatory cells of children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Acta biochimica Polonica* 2009;56:361-370.
244. Ramirez E, Cartier L, Rodriguez L, Alberti C, Valenzuela MA: In vivo fluctuation of tax, foxp3, ctla-4, and gitr mrna expression in cd4(+)/cd25(+) t cells of patients with human t-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *Brazilian journal of medical and biological research (Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica)* 2010;43:1109-1115.

245. Baltz KM, Krusch M, Bringmann A, Brossart P, Mayer F, Kloss M, Baessler T, Kumbier I, Peterfi A, Kupka S, Kroeber S, Menzel D, Radsak MP, Rammensee HG, Salih HR: Cancer immunoediting by gitr (glucocorticoid-induced tnf-related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions. *Faseb J* 2007;21:2442-2454.
246. Cho JS, Hsu JV, Morrison SL: Localized expression of gitr-l in the tumor microenvironment promotes cd8+ t cell dependent anti-tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1057-1069.
247. Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, Ayroldi E, Riccardi C: Gitr, a member of the tnf receptor superfamily, is costimulatory to mouse t lymphocyte subpopulations. *European journal of immunology* 2004;34:613-622.
248. Tone M, Tone Y, Adams E, Yates SF, Frewin MR, Cobbold SP, Waldmann H: Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for t cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:15059-15064.
249. Nocentini G, Riccardi C: Gitr: A multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *European journal of immunology* 2005;35:1016-1022.
250. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC: Cd4(+)cd25(+) immunoregulatory t cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced tnf receptor. *Immunity* 2002;16:311-323.
251. Kim JI, Sonawane SB, Lee MK, Lee SH, Duff PE, Moore DJ, O'Connor MR, Lian MM, Deng S, Choi Y, Yeh H, Caton AJ, Markmann JF: Blockade of gitr-gitrl interaction maintains treg function to prolong allograft survival. *European journal of immunology* 2010;40:1369-1374.
252. Ramirez-Montagut T, Chow A, Hirschhorn-Cymerman D, Terwey TH, Kochman AA, Lu S, Miles RC, Sakaguchi S, Houghton AN, van den Brink MR: Glucocorticoid-induced tnf receptor family related gene activation overcomes tolerance/ignorance to melanoma differentiation antigens and enhances antitumor immunity. *J Immunol* 2006;176:6434-6442.
253. Watts TH: Tnf/tnfr family members in costimulation of t cell responses. *Annual review of immunology* 2005;23:23-68.

254. Bushell A, Wood K: Gitr ligation blocks allograft protection by induced cd25+cd4+ regulatory t cells without enhancing effector t-cell function. *Am J Transplant* 2007;7:759-768.
255. Wilde B, Dolff S, Cai X, Specker C, Becker J, Totsch M, Costabel U, Durig J, Kribben A, Tervaert JW, Schmid KW, Witzke O: Cd4+cd25+ t-cell populations expressing cd134 and gitr are associated with disease activity in patients with wegener's granulomatosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:161-171.
256. Lee HS, Shin HH, Kwon BS, Choi HS: Soluble glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (sgitr) increased mmp-9 activity in murine macrophage. *Journal of cellular biochemistry* 2003;88:1048-1056.
257. Lahey TP, Loisel SD, Wieland-Alter W: Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein triggering enhances hiv-specific cd4+ t cell cytokine secretion and protects hiv-specific cd4+ t cells from apoptosis. *The Journal of infectious diseases* 2007;196:43-49.
258. Shevach EM, Stephens GL: The gitr-gitrl interaction: Co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nature reviews* 2006;6:613-618.
259. Coe D, Begom S, Addey C, White M, Dyson J, Chai JG: Depletion of regulatory t cells by anti-gitr mab as a novel mechanism for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1367-1377.
260. Placke T, Kopp HG, Salih HR: Glucocorticoid-induced tnfr-related (gitr) protein and its ligand in antitumor immunity: Functional role and therapeutic modulation. *Clinical & developmental immunology* 2010;2010:239083.

STRESZCZENIE

Komórki T regulatorowe (Tregs) stanowią małą populację (5-10%) obwodowych limfocytów T CD4+. Charakteryzują się one obecnością cząsteczek powierzchniowych CD4, CD25, CTLA-4, GITR oraz czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Spośród nich FoxP3 wydaje się być najbardziej wiarygodnym markerem, jako że jego obecność warunkuje ich rozwój i funkcje. Główną rolą Tregs jest hamowanie aktywności komórek układu odpornościowego i indukowanie tolerancji obwodowej. Zaburzenia czynnościowe i ilościowe Tregs przyczyniają się do rozwoju chorób nowotworowych, infekcyjnych, autoimmunizacyjnych, alergii czy odrzuceń przeszczepów.

Tregs powstają głównie w grasicy, ale również na obwodzie. Sugeruje się, że TGF- β jest zaangażowany w ten proces, indukując powstawanie FoxP3+ Tregs z ich naiwnych prekursorów. Ponadto, aktywność i funkcje Tregs są wynikiem zależności występujących pomiędzy CTLA-4, CD28 oraz GITR, jako że wpływają one na zdolności stymulacyjne komórek prezentujących antygen (APC). Tregs na drodze supresji mogą skutecznie hamować odpowiedź przeciwnowotworową. Możliwość kontroli supresorowych funkcji Tregs lub/ oraz ich liczebności w mikrośrodkowisku nowotworu jest obiecującym podejściem terapeutycznym w leczeniu nowotworów.

Określono odsetek Tregs, stężenie TGF- β oraz względny poziom transkryptu genów *FOXP3*, *CTLA-4*, *CD28* oraz *GITR* w nowotworowych i nienowotworowych wysiękach opłucnowych. Odsetek Tregs, określony na podstawie ekspresji cząsteczek CD4, C25 oraz FoxP3, został zmierzony metodą cytometrii przepływowej. Stężenie TGF- β określono techniką ELISA a względny poziom transkryptu badanych genów reakcją Real-Time PCR z zastosowaniem sond hydrolizujących typu *TaqMan*.

Wykazano istotny statystycznie wzrost odsetka Tregs w nowotworowych wysiękach opłucnowych zawierających komórki nowotworowe w porównaniu z wysiękami nienowotworowymi, w nowotworowych wysiękach opłucnowych bez komórek nowotworowych w porównaniu z wysiękami nienowotworowymi oraz pomiędzy sumą wysięków nowotworowych a wysiękami nienowotworowymi. Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy grupami wysięków nowotworowych. Stężenie TGF- β w badanych środowiskach było porównywalne i nie wykazano korelacji pomiędzy nim a odsetkiem Tregs. Względny poziom transkryptu genów

FOXP3, *CTLA-4*, *CD28* oraz *GITR* był wyższy w grupie komórek CD4+CD25+ w stosunku do komórek CD4+CD25-. Względny poziom transkrypty genów *FOXP3*, *CTLA-4* oraz *CD28* był istotnie statystycznie wyższy w komórkach CD4+CD25+ pozyskanych z wyсіęków nowotworowych w porównaniu z komórkami CD4+CD25+ pozyskanymi z wyсіęków nienowotworowych. Występowały korelacje pomiędzy wzrostami względnych poziomów transkrypty badanych genów z wyjątkiem genu *GITR* i *CD28* w grupie wszystkich komórek CD4+CD25+ oraz grupie komórek CD4+CD25+ pozyskanych z nowotworowych wyсіęków opłucnowych. W grupie komórek CD4+CD25+ pozyskanych z wyсіęków nienowotworowych nie występowały korelacje pomiędzy genem *GITR* a pozostałymi genami.

Wyższy odsetek Tregs i wyższy względny poziom transkrypty genów kodujących cząsteczki będące głównymi regulatorami aktywności i funkcji Tregs (szczególnie *FOXP3*, *CD28* i *CTLA-4*) w wyсіękach nowotworowych w porównaniu z nienowotworowymi sugeruje, że komórki te pełnią istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej w mikrośrodoisku nowotworu.

SUMMARY

Regulatory T cells (Tregs) are a small subset (5-10%) of the overall CD4⁺ T cell population. They are characterized mainly by the expression of CD4, CD25, CTLA-4, GITR surface molecules and FoxP3 transcription factor. Among them FoxP3 seems to be the most relevant marker, as its presence is required for Tregs development and function. Tregs can profoundly suppress host immune responses and induce self-tolerance. Thus, functional and quantitative imbalance of Tregs can cause numerous lesions including cancers, allergies, autoimmune, transplantation and infectious diseases.

Tregs differentiate mainly in the thymus, but this process occurs also in the periphery. It is suggested that TGF- β is involved in this process, inducing differentiation of FoxP3⁺ Tregs from naïve precursors. Furthermore, relationships between CTLA-4, CD28 and GITR are responsible for Tregs activity and function as they influence antigen presenting cells (APC) stimulatory capacity. Tregs using their suppressive mechanism can efficiently inhibit anticancer response, leading to immune tolerance of tumor cells. Thus, the ability to control the suppressive function or/and number of Tregs in the cancer microenvironment has a promising therapeutic approach.

The percentage of Tregs, level of TGF- β and relative level of *FOXP3*, *CTLA-4*, *CD28* and *GITR* genes transcripts in malignant and non-malignant pleural effusions were measured. The percentage of Tregs; as defined (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺); was determined by means of multicolor flow cytometry system. TGF- β level was defined using human TGF- β 1 ELISA kit. Relative level of studied genes transcripts was measured by Real-Time PCR with a use of hydrolysis *TaqMan* probes.

Statistically significant increase in percentage of Tregs was found in malignant pleural effusions containing malignant cells comparing to non-malignant, malignant pleural effusions without malignant cells comparing to non-malignant and in both groups of malignant effusions comparing to non-malignant. However levels of TGF- β in all analyzed groups were comparable and no correlation was observed between concentration of TGF- β and percentage of Tregs. Relative levels of *FOXP3*, *CTLA-4*, *CD28* and *GITR* genes transcripts were higher in CD4⁺CD25⁺ cells comparing to CD4⁺CD25⁻. Relative level of *FOXP3*, *CTLA-4* and *CD28* genes transcripts was significantly higher in CD4⁺CD25⁺ cells from malignant pleural effusions comparing

to non-malignant. There were correlations between levels of all genes transcripts except *GITR* and *CD28* in a whole group of CD4+CD25+ cells and CD4+CD25+ cells from malignant pleural effusions. There were no correlations between *GITR* and any other gene among CD4+CD25+ cells from non-malignant pleural effusions.

Higher level of Tregs and higher relative transcripts level of genes coding molecules which are key players in activity and suppressive function of Tregs (especially *FOXP3* and *CTLA-4*) in malignant pleural effusions as compared to non-malignant, imply their essential role in cancer immunosuppressive mechanism.