

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. L. HIRSZFELDA
POLSKA AKADEMIA NAUK



Bożena Ścirka

„Zróżnicowanie repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) w przebiegu eksperymentalnej immunoterapii mysiego czerniaka B16 przeciwciałem anti-GITR.”

„Diversity of the repertoire of T-cell antigen receptors (TCR) in the course of experimental immunotherapy of B16 melanoma with anti-GITR antibody.”

Promotor:

dr hab. Arkadiusz Miązek

Wrocław 2019

Składam serdeczne podziękowania:

Promotorowi dr hab. Arkadiuszowi Miążkowi:

Za nieocenioną pomoc w prowadzeniu eksperymentów, promotorstwo, pomoc i życzliwość okazaną mi podczas pisania tej pracy.

dr hab. Leszkowi Ignatowiczowi:

Za przekazaną wiedzę, która poszerzyła moje spojrzenie na immunologię, naukową opiekę, pomoc i cenne uwagi.

prof. dr hab. Pawłowi Kisielowowi:

Za umożliwienie pracy w Zakładzie Immunologii Nowotworów, cotygodniowe spotkania i dyskusje, rozwijające poglądy młodego doktoranta.

dr Mikołajowi Kłossowiczowi:

Za pomoc i wsparcie podczas prowadzenia wielogodzinnych eksperymentów, sugestie i wskazówki dotyczące pracy.

dr K. Marek – Bukowiec, mgr inż. M. Lisowskiej, mgr J. Suchanek:

Za wzajemne wsparcie i pracę zespołową, wspólne sukcesy i porażki podczas trudnej pracy laboratoryjnej.

Zespołowi dr hab. Małgorzaty Cebrat: Łukaszowi Śnieżewskiemu, Monice Kaszturze, Agnieszce Łaszkiewicz, Sylwii Janik za koleżeńską pomoc w realizacji eksperymentów.

Mojej mamie Lidii Ścirce:

Za lata wyrzeczeń i ciężką pracę, dzięki której mogłam studiować i zdobywać kolejne stopnie naukowe.

W wyniku realizacji niniejszej pracy doktorskiej powstała następująca publikacja:

- **Bożena Ścirka**, Edyta Szurek, Maciej Pietrzak, Grzegorz Rempala, Paweł Kisielow, Leszek Ignatowicz, Arkadiusz Miążek. Anti-GITR Antibody Treatment Increases TCR Repertoire Diversity of Regulatory but not Effector T Cells Engaged in the Immune Response Against B16 Melanoma. Arch. Immunol. Ther. Exp.: 65 (2017)

Rezultaty pracy zaprezentowano na następujących wydarzeniach naukowych:

- „Przeciwnowotworowa terapia przeciwciałem DTA-1 na poziomie indywidualnych klonów limfocytów T”, IITD PAN we Wrocławiu, 16.05.2013 - **wykład**
- „Diversity and function of CD4⁺ T-cells in GITR stimulation-based cancer immunotherapy”, 15 Zjazd Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej we Wrocławiu, 26-28.06.2014 - **wykład**
- “Ion Torrent – Sekwencjonowanie Nowej Generacji”, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu 24.10.2014 – **prezentacja**
- “Diversity and function of CD4⁺ T-cells in GITR stimulation-based cancer immunotherapy” zaprezentowany na 15 Zjeździe Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej we Wrocławiu, 26-28.06.2014 - **plakat**
- “Therapeutic effect of anti-GITR treatment on regulatory T-cells in cancer immunotherapy.” zaprezentowany na I Ogólnopolskiej Konferencji Młodych Naukowców Nauk Przyrodniczych „Wkraczając w świat nauki 2014”, 11-12.09. 2014 - **plakat**

Badania zrealizowano w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) o numerze: (N N401 066538)

Dodatkowo część pracy została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki, w ramach grantu PRELUDIUM (2011/01/N/NZ6/03683), kierowanego przez doktorantkę.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	8
SUMMARY	10
1. WSTĘP	12
1.1. Biologia czerniaka złośliwego.....	12
1.2. Rola limfocytów T w swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej.....	19
1.2.1. Limfocyty T cytotoksyczne.....	21
1.2.2. Limfocyty Th pomocnicze.....	22
1.2.3. Limfocyty T regulatorowe.....	23
1.2.4. Limfocyty T γ / δ	29
1.3. Immunoedytowanie.....	30
1.4. Centralna i obwodowa tolerancja immunologiczna a immunogenność nowotworu.....	34
1.5. Tworzenie i zróżnicowanie repertuaru receptorów antygenowych (TCR) limfocytów T.....	37
1.6. Sekwencjonowanie następnej generacji a badanie repertuaru TCR.....	41
1.7. Immunoterapie nowotworów - strategie i cele molekularne.....	42
1.7.1. Immunoterapia nowotworów a komórki T regulatorowe.....	45
1.7.2. GITR.....	46
2. CEL PRACY	52
3. MATERIAŁY I METODY	53
3.1. Materiał laboratoryjny.....	53
3.1.1. Media hodowlane.....	53
3.1.2. Bufory.....	54

3.1.3.	Przeciwciała.....	55
3.1.4.	Startery molekularne.....	56
3.1.5.	Odczynniki i sprzęt wykorzystane w eksperymentach.....	58
3.1.6.	Zwierzęta eksperymentalne.....	61
3.1.7.	Materiał biologiczny.....	62
3.1.7.1.	Linie komórkowe.....	62
3.1.7.2.	Przeciwciało anty-GITR (DTA-1).....	63
3.2.	Metody doświadczalne.....	64
3.2.1.	Schemat eksperymentów.....	64
3.2.2.	Eksperymenty na zwierzętach.....	64
3.3.	Metody pozyskiwania limfocytów T.....	66
3.3.1.	Izolacja limfocytów T z narządów limfatycznych.....	66
3.3.2.	Izolacja limfocytów T z organów nie limfatycznych.....	66
3.4.	Metody cytofluorymetryczne.....	67
3.4.1.	Analiza cytofluorymetryczna fenotypu.....	67
3.4.2.	Cytofluorymetryczne genotypowanie myszy transgenicznych.....	68
3.4.3.	Sortowanie komórek.....	69
3.5.	Tworzenie hybrydom limfocytów T.....	69
3.5.1.	Fuzja.....	70
3.5.2.	Testy swoistości hybrydom.....	71
3.6.	Metody biologii molekularnej dotyczące DNA i RNA.....	74
3.6.1	Izolacja genomowego DNA z ogonów.....	74
3.6.2.	Genotypowanie myszy transgenicznych.....	74
3.6.3.	Izolacja RNA z limfocytów T.....	75
3.6.4.	Synteza cDNA.....	76
3.7.	Metody rozdzielania i oczyszczania DNA.....	76

3.7.1.	Elektroforeza DNA genomowego.....	76
3.7.2.	Elucja DNA z żelu agarozowego.....	77
3.7.3.	Oczyszczanie produktów reakcji PCR z mieszaniny poreakcyjnej.....	77
3.8.	Tworzenie bibliotek regionów CDR3.....	78
3.9.	Tworzenie bibliotek regionów CDR3 z hybrydom limfocytów T.....	81
3.10.	Sekwencjonowanie na platformie Ion Torrent.....	83
3.11.	Analiza statystyczna wyników.....	85
4.	WYNIKI.....	85
4.1.	Charakterystyka myszy TCR ^{mini} Foxp3 ^{GFP} oraz czerniaka B16 A ^b Ep63K.....	85
4.2.	Wpływ przeciwciała DTA-1 na zahamowanie wzrostu guza nowotworowego.....	87
4.3.	Proporcje, fenotyp i poziom aktywacji limfocytów T ef i T reg w czasie odpowiedzi przeciwnowotworowej.....	89
4.4.	Wpływ nowotworu na repertuar receptorów TCR komórek CD4 ⁺ T efektorowych i regulatorowych.....	94
4.5.	Wpływ traktowania DTA-1 u myszy obarczonych nowotworem w repertuarze TCR CD4 ⁺ T ef i T reg.....	96
4.6.	Identyfikacja receptorów TCR specyficznych wobec czerniaka B16 A ^b Ep63K.....	102
4.7.	Analiza różnorodności klonów Tef i Treg współdzielących ten sam nowotworowo –specyficzny repertuar TCR.....	106
5.	DYSKUSJA I WNIOSKI.....	109
6.	WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW.....	115
7.	SPIS TABEL I RYSUNKÓW.....	120

7.1.	Tabele.....	120
7.2.	Rysunki.....	121
7.3.	Strony internetowe.....	123
8.	LITERATURA.....	123

STRESZCZENIE

Limfocyty T (T reg) są subpopulacją limfocytów T, która hamuje odpowiedź immunologiczną i indukuje tolerancję wobec własnych antygenów. Hamowanie odpowiedzi immunologicznej może również prowadzić do osłabienia odpowiedzi przeciwnowotworowej. Szereg badań naukowych potwierdza, że nagromadzenie tych komórek w obrębie nowotworu promuje jego wzrost. Dlatego też, istotnym celem immunoterapii przeciwnowotworowej jest wybiórcze osłabienie aktywności supresorowej limfocytów T regulatorowych i jednocześnie promowanie aktywności limfocytów T efektorowych, specyficznych wobec antygenów nowotworowych. Obiecującą strategią immunoterapii testowanej na mysim modelu doświadczalnym jest stymulacja receptora GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein - CD357) agonistycznym przeciwciałem monoklonalnym DTA-1. Cząsteczka GITR jest transbłonowym białkiem typu I o długości 228 aa, należącym do rodziny TNF. Występuje w dużej gęstości na powierzchni T reg i aktywowanych T ef. Badania *in vitro* i *in vivo* wskazują, że równoczesna stymulacja cząsteczek GITR i receptorów dla antygeny (TCR) powoduje zahamowanie funkcji supresorowej T reg i wpływa na aktywację komórek efektorowych. Podjęte w pracy badania mają na celu zidentyfikowanie jak wiązanie GITR, przez przeciwciało DTA-1, wpływa na klonalną różnorodność i funkcje komórek T, swoistych dla antygenów nowotworowych.

Badania oparto na unikalnym modelu myszy $TCR^{mini}Foxp3^{GFP}$, których różnorodność receptorów TCR została ograniczona w celu umożliwienia monitorowania zmian w ich repertuarze na poziomie pojedynczych, funkcjonalnie odrębnych klonów, swoistych dla antygenów nowotworowych. Dzięki temu możliwa jest pełna charakterystyka repertuarów receptorów TCR na różnych subpopulacjach limfocytów zaangażowanych w odpowiedź przeciwnowotworową. U myszy TCR^{mini} , których wszystkie receptory posiadają ten sam transgeniczny łańcuch $TCR\beta$ ($V\beta 14D\beta 2J\beta 2.6$), różnorodność łańcuchów $TCR\alpha$ ogranicza rearanżujący mini locus złożony z pojedynczego segmentu $V\alpha 2.9$ oraz 2 segmentów $J\alpha$ ($J\alpha 26$ i $J\alpha 2$). Myszy te rozwijają normalnie funkcjonujące subpopulacje limfocytów T o zredukowanym, poliklonalnym repertuarze receptorów $TCR\alpha\beta$. Dodatkowo myszy $TCR^{mini}FoxP3^{GFP}$ posiadają genetyczny znacznik limfocytów T reg ($FoxP3^+$), w postaci ekspresji zielonego białka fluorescencyjnego (GFP). Część wstępnych doświadczeń wykonano na myszach transgenicznych $FoxP3^{GFP}$. Posiadają one wyżej opisany znacznik komórek

regulatorowych w kontekście niezawężonego repertuaru TCR myszy, szczepu C57Bl/6 (B6).

Jako nowotwór modelowy wykorzystano myszą linię czerniaka B16, zmodyfikowaną genetycznie do ekspresji neo-antygeny (peptyd Ep63K). Ten neo-antygen jest prezentowany na powierzchni komórek czerniaka B16 w kontekście MHC klasy II-A^b, (II-A^bEp63K). We wcześniejszych pracach wykazano, że tak zmieniona linia czerniaka B16, po podskórnym wszczepieniu myszom transgenicznym TCR^{mini}FoxP3^{GFP}, aktywuje co najmniej 20 różnych receptorów TCR komórek T CD4⁺ efektorowych. Częstość występowania i obecność wśród różnych populacji limfocytów T wspomnianych receptorów, daje możliwość wglądu w przebieg odpowiedzi przeciwnowotworowej i jej modulacji na skutek podania przeciwciała DTA-1. W trakcie realizacji projektu założono ocenę:

- wpływu immunoterapii anty-GITR na zahamowanie kinetyki wzrostu guza nowotworowego,
- wpływu immunoterapii anty-GITR na zmiany w populacjach komórek T reg i T ef podczas rozwoju nowotworu,
- analizę wrażliwości komórek T ef na supresyjne działanie T reg izolowanych z guzów i węzłów chłonnych drenujących, podczas rozwoju choroby i terapii przeciwciałem DTA-1,
- wpływu immunoterapii anty-GITR na repertuar receptorów TCR komórek T reg i T ef w odpowiedzi na nowotwór.

SUMMARY

T-lymphocytes (T reg) are a subpopulation of T lymphocytes that suppress the immune response and induce tolerance to their own antigens. Inhibition of the immune response may also lead to a weakening of the anti-tumor response. A number of scientific studies confirm that the accumulation of these cells within the tumor promotes its growth. Therefore, an important goal of anti-cancer immunotherapy is selective inhibition of suppressor activity of T reg lymphocytes and at the same time promoting the activity of effector T cells, specific for tumor antigens. A promising strategy for immunotherapy tested on a mouse experimental model is stimulation of the GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein - CD357) agonist monoclonal antibody DTA-1. The GITR molecule is a transmembrane type I protein with a length of 228 aa, belonging to the TNF family. It occurs in high density on the surface of T reg and activated T ef. *In vitro* and *in vivo* studies indicate that the simultaneous stimulation of GITR molecules and antigen receptors (TCR) suppresses the T suppressor function and affects T ef activation. The research undertaken in this study aims to identify how GITR binding by the DTA-1 antibody influences the clonal diversity and function of T cells specific for tumor antigens.

The research was based on the unique TCR^{mini}Foxp3^{GFP} mouse model, in which the diversity of TCR receptors has been limited in order to be able to monitor changes in their repertoire at the level of individual, functionally separate clones, specific for tumor antigens. Thanks to this, it is possible to fully characterize TCR receptor repertoires on various lymphocyte subpopulations involved in the antitumor response. In TCR^{mini} mice, all of which have the same transgenic TCR β chain (V β 14D β 2J β 2.6), the diversity of TCR α chains limits the rearranging mini locus comprised of a single V α 2.9 segment and two J α segments (J α 26 and J α 2). These mice develop normally functioning T-cell subpopulations with a reduced, polyclonal TCR $\alpha\beta$ receptor repertoire. In addition, TCR^{mini}Foxp3^{GFP} mice possess a genetic T-cell marker reg (FoxP3⁺) in the expression of green fluorescent protein (GFP⁺). Some of the preliminary experiments were also performed on FoxP3^{GFP} transgenic mice. They possess the above-described label of T regulatory cells in the context of a non-concentrated TCR repertoire of mice, strain C57Bl / 6 (B6).

As a model tumor, a murine B16 melanoma line, genetically modified for the expression of neo-antigen (Ep63K peptide), was used. This neo-antigen is presented on the surface of B16 melanoma cells in the context of MHC class II-Ab, (II-AbEp63K). Previous work has demonstrated that the B16 melanoma line modified this way after subcutaneous implantation into TCR^{mini}Foxp3^{GFP} transgenic mice activates at least 20 different TCR receptor T effector CD4⁺ cells. The frequency of occurrence and presence among various T-cell populations of the mentioned receptors gives the possibility of insight into the course of the anti-tumor response and its modulation due to the administration of the DTA-1 antibody. During the project implementation an assessment was made:

- influence of anti-GITR immunotherapy on suppression of tumor growth kinetics,
- influence of anti-GITR immunotherapy on changes in the T reg and T ef cell populations during tumor development,
- analysis of sensitivity of T ef cells to the suppressive action of T reg isolated from tumors and lymph nodes draining during disease development and therapy with DTA-1 antibody,
- the impact of anti-GITR immunotherapy on the TCR receptor repertoire T reg and T ef cells in response to cancer.

1. WSTĘP

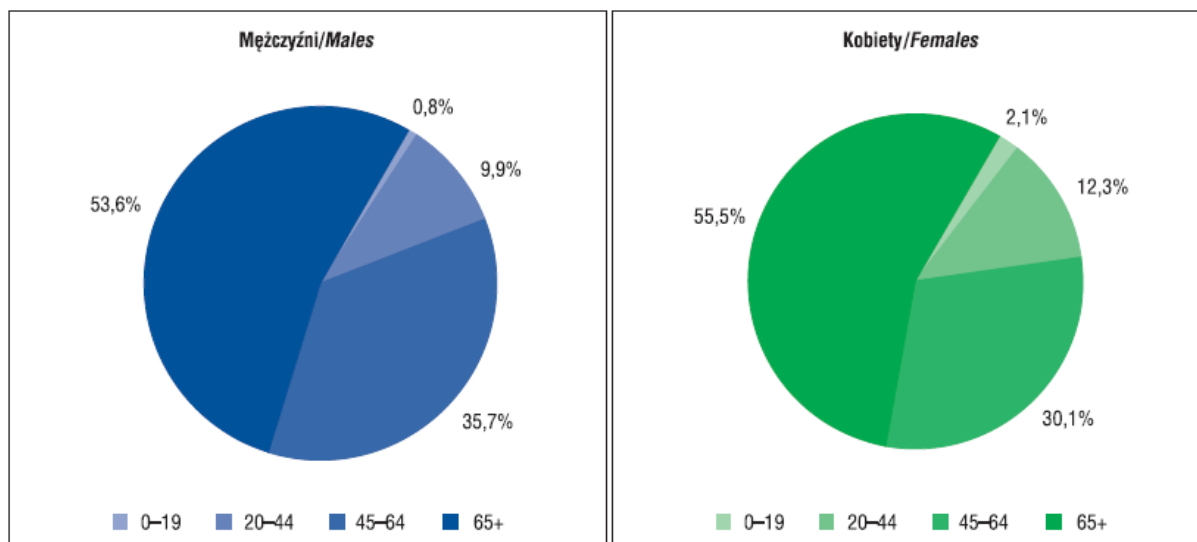
Gwałtowny rozwój cywilizacji, przemysł oraz postępująca degradacja środowiska wpływa negatywnie na zdrowie i życie ludzi na całym świecie. Jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia człowieka uznaje się choroby nowotworowe. Dane statystyczne Polskiej Unii Onkologii wskazują, że do 2020 r. na świecie zachoruje na nowotwory ok. 20 mln osób, z czego umrze 10 mln. Nowotwory złośliwe stanowią drugą przyczynę zgonów w Polsce, ponad 26% mężczyzn i 23% kobiet umiera. Choroby te są główną przyczyną umieralności przed 65 rokiem życia i na tym tle Polska negatywnie wyróżnia się wśród krajów europejskich [Wojciechowska et al. 2009].

1.1. Biologia Czerniaka Złośliwego

Czerniak (łac. *melanoma malignum*) jest to nowotwór złośliwy melanocytów (komórek barwnikowych skóry) wytwarzających melanicę. Powstanie i rozwój jest zależne od predyspozycji genetycznych (ok. 10% przypadków) oraz czynników środowiskowych (promieniowanie UV). Czerniak skóry z największą częstością występuje wśród osób rasy kaukaskiej, szczególnie wrażliwych na promieniowanie słoneczne. Należy do najbardziej agresywnych nowotworów, opornych na standardowe leczenie onkologiczne. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), rocznie około 66,000 pacjentów umiera z powodu nowotworów skóry, w tym 80% na czerniaka (Gawlik et al. 2011) (Ryc. 1). Liczba zachorowań na czerniaka skóry w Polsce wzrasta po 20 roku życia, przy czym najwięcej zachorowań obu płci notuje się między 50 a 64 rokiem życia (ponad 1/3 kobiet i mężczyzn). Ryzyko zachorowania na czerniaka skóry wzrasta z wiekiem, osiągając maksimum w ósmej dekadzie życia (<http://onkologia.org.pl/czerniak-skory-c43>).

Jedyną skuteczną metodą leczenia pacjentów jest interwencja chirurgiczna w początkowych fazach rozwoju nowotworu. Operacja, na wczesnym etapie choroby, pozwala zapobiec rozprzestrzenianiu nowotworu do narządów wewnętrznych organizmu i daje szansę na pełne wyleczenie. W fazie przerzutów czerniak złośliwy uważany jest za chorobę nieuleczalną. Standardowe metody terapii takie jak chemioterapia czy radioterapia są zazwyczaj częścią leczenia paliatywnego,

ograniczonego do próby zahamowania wzrostu guza pierwotnego. Pojawienie się zmian nowotworowych w innych organach zmniejsza rokowania, a zastosowanie terapii staje się nieskuteczne.



Ryc. 1. Struktura zachorowań na czerniaka w zależności od płci i wieku. Prognoza do 2025 r. (Wojciechowska et al. 2009).

Obecne badania nad rozwojem czerniaka skóry wskazują na ważną rolę tzw. mikrośrodowiska tworzonego przez: keratynocyty, fibroblasty, komórki śródbłonkowe oraz komórki układu odpornościowego wraz z melanocytami (Ryc. 2). Utrata homeostazy oraz zaburzenie kontaktu między keratynocytami a melanocytami może wpływać na rozwój czerniaka. Wykazano, że melanocyty hodowane bez udziału keratynocytów posiadają na swojej powierzchni antygeny związane z czerniakiem: białko adhezyjne MCAM, integrynę $\alpha\beta_3$, które są głównymi regulatorami wzrostu komórek czerniaka. Utrata kontaktu pomiędzy melanocytami a keratynocytami promuje podziały melanocytów, będące pierwszym etapem transformacji nowotworowej [Haass et al. 2005, Li G et al. 2002]. Zjawisko to powodowane jest zmniejszaniem, brakiem ekspresji lub obecnością niefunkcjonalnej E-kadheryny, która w komórkach czerniaka zwiększa ich wrażliwość na apoptozę, zmniejsza ilość białek inwazyjnych, przywraca kontrolę wzrostu przez keratynocyty [Kippenberger et al. 2006, Tang et al. 1994]. W kolejnych etapach nowotworzenia fibroblasty CAFs promują wzrost nowotworu poprzez wydzielanie czynników wzrostu IGF-1, SC (scatter factor), bFGF, TGF- β i endoteliny. CAFs regulują proces angiogenezy, organizują podścielisko wytwarzając komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen,

fibronektyna, laminina). Biorą udział w rozkładzie macierzy pozakomórkowej (wydzielają proteazy rozkładające głównie kolagen I np. białka z grupy metaloproteinaz (MMP1) oraz proteazę serynową FAP, co umożliwia przemieszczanie się komórek i tworzenie przerzutów [Orimo et al. 2006, Ruiter et al. 2002]. Nadekspresja FAP koreluje z gorszą prognozą dla pacjentów, u których zdiagnozowano m.in. czerniaka [Puré, 2009]. Wczesne etapy choroby wskazują, że CAFs początkowo mogą działać hamująco na jej rozwój (fibroblasty z aktywną ścieżką NOTCH1) [Shao, 2011].

Kluczowe znaczenie dla postępu nowotworu mają miofibroblasty (przekształcone fibroblasty), które promują wzrost i inwazję nowotworu oraz zróżnicowane fibroblasty obecne wewnątrz guza. Fibroblasty pełnią funkcję swoistego rusztowania dla masy guzowej [Ruiter et al. 2002, Li et al. 2002] i wchodzi w bezpośredni kontakt z komórkami czerniaka, sprzyjając jego inwazyjności (obecność białka adhezyjnego ADAM-9). Wspólnie z komórkami śródbłonna, makrofagami, płytkami krwi wydzielają białko PAR-1, które jest niezbędne w procesie stanu zapalnego, koagulacji oraz przerzutowaniu guza [Olbryt, 2013].



Ryc. 2. Zdjęcie czerniaka w początkowej fazie choroby.

([https://pl.wikipedia.org/wiki/Czerniak_\(nowotw%C3%B3r\)](https://pl.wikipedia.org/wiki/Czerniak_(nowotw%C3%B3r))).

Najważniejszymi procesami rozwoju guza w mikrośrodowisku jest: angiogeneza i limfogeneza. Rozrost guza i jego rozsiew wspomagają komórki śródbłonkowe (współtworzenie nowych naczyń krwionośnych) oraz makrofagi, które stymulują proliferację komórek czerniaka, proces angiogenezy i zjawisko immunosupresji [Basu et al. 2009]. Etap przerzutowania powiązany jest z obecnością swoistych białek adhezyjnych na powierzchni komórek nowotworowych i endotelium np. białka JAMs [Ghislin et al. 2011] oraz efryny np. białka EphB4. Efryny na powierzchni komórek

czerniaka sprzyjają adhezji do komórek endotelialnych, które wytwarzają ligand efrynę B2. Dzięki temu możliwy jest rozsiew komórek czerniaka do specyficznych narządów np. płuc, nerek, wątroby. Czerniak rozsiewany jest również drogą limfatyczną. Naczynia limfatyczne aktywnie przyciągają komórki nowotworowe do docelowych miejsc tworzenia przerzutów np. aktywacja ścieżki CXCR4/SDF. Komórki czerniaka ekspresjonujące białko CXCR4 umiejscawiają się w docelowych narządach, których naczynia limfatyczne wydzielają czynnik SDF-1 [Olbryt, 2013].

W początkowym okresie wzrostu guza makrofagi są pierwszą linią obrony. Zaczynają sprzyjać progresji choroby np. w przewlekłym stanie zapalnym, mogą inicjować proces nowotworzenia. Makrofagi te określane są jako TAM (tumor-associated macrophages), aktywowane komórki związane z nowotworami. Ich rola w rozwoju guza zależy od wytwarzanych cytokin oraz czynnika CSF-1. Makrofagi zasiedlające czerniaka nazywane są melanofagami ponieważ zawierają w swoich strukturach melaninę pochodzącą od pochłoniętych komórek czerniaka. Obecność makrofagów w zmianach skórnych, oku oraz błonach śluzowych nosa korelują z gorszą prognozą u pacjentów. W skórze makrofagi osiedlają się przede wszystkim w ogniskach pierwotnych, następnie w mniejszym stopniu, w przerzutach i znamionach. Ekspresjonują prozapalne białko COX-2, mediator stanu zapalnego promujący proces kancerogenezy w tkankach epithelialnych [Sethi et al. 2012].

Melanofagi uczestniczą w angiogenezie (IL-10), przerzutowaniu (TGF- β) oraz immunosupresji (IL-10). Zmniejszona ekspresja niektórych cytokin może prowadzić do upośledzenia rekrutacji limfocytów T w miejsce rozwijającego się nowotworu. Makrofagi mogą również ulegać fuzji z komórkami czerniaka tworząc hybrydy o większej zdolności do autofagii, efektorowe komórki pamięci TEM (effector memory T cell) [Olbryt, 2013].

Badania ostatnich lat sugerują ważną rolę hipoksji w rozwoju czerniaka złośliwego. Zauważono, że w skórze łagodna hipoksja (3-5% O₂) jest stanem naturalnym i utrzymuje się na zbliżonym poziomie. Bedogni i Powell jako pierwsi zasugerowali udział hipoksji w transformacji nowotworowej melanocytów. Zauważyli, że aktywacja ścieżki HIF-1 (głównego regulatora odpowiedzi komórek na stan niedotlenowania), w wyniku aktywacji np. onkogenu BRAF czy MITF, zapobiega starzeniu się melanocytów [Bedogni et al. 2009]. Stan ten wpływa w istotny sposób na

takie procesy jak: angiogeneza, immunosupresja, etapy przerzutowania czy upośledzenie odpowiedzi immunologicznej. Eksperymenty na myszach przeprowadzone przez Nomana i wsp. wskazują wpływ hipoksji na oporność intensywnie proliferujących komórek nowotworowych, wobec litycznego działania limfocytów T cytotoksycznych [Noman et al. 2011].

Ostatnie lata wskazują na poszukiwanie alternatywnych form terapii przeciw czerniakowi. Poszukiwania obejmują m. in. stymulację układu immunologicznego. Immunoterapia jako metoda leczenia, w pośredni lub bezpośredni sposób, wykorzystuje układ odpornościowy do zaatakowania komórek nowotworowych (także macierzystych komórek guza) lub złagodzenia skutków ubocznych działania leków przeciwnowotworowych. Nieswoiste (pośrednie) pobudzanie układu immunologicznego związane jest z terapią IFN- α , IL-2 oraz poprzez immunostymulatory pochodzące z obcych organizmów. Z kolei swoiste oddziaływanie na nowotwór powiązane jest z konkretnymi antygenami nowotworowymi. Czerniak należy do grupy nowotworów immunogennych tzn. jest zdolny aktywować układ immunologiczny [Hodi et al. 2010, Bhatia et al. 2009].

Większość antygenów obecnych na komórkach nowotworowych jest współdzielona ze zdrowymi komórkami. Są to antygeny różnicowania np. gp100, Melan-A czy tyrozynaza. Antygeny te występują na prawidłowych melanocytach, jak również komórkach wywodzących się z czerniaka. Są najczęściej rozpoznawane przez przeciwciała oraz limfocyty T. Nie są nowotworowo specyficzne a ich obecność na prawidłowych komórkach może prowadzić do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Występują zarówno we wczesnej jak i późnej fazie zaawansowania choroby. Są najczęściej spotykane w czerniakach dających już przerzuty [Hodi et al. 2006]. Nowotwory skóry mają szerokie podłoże rozwoju choroby: mutacje w genach odpowiedzialnych za proliferację i apoptozę, zmiany epigenetyczne, wytwarzanie autokrynych czynników wzrostu, utrata zdolności do adhezji. Czynniki te wywołują zmiany w szlakach przekazywania sygnałów w melanocytach i uwalniają je spod ścisłej kontroli keratynocytów. Zmiany genetyczne wywołują efekt plejotropowy, w kształtowaniu, którego czynniki transkrypcyjne pełnią ważną rolę. Zmiany w poziomie i aktywności czynników transkrypcyjnych: MITF, NF κ B, AP-1, AP-2 α , Notch, CREB, Ets-1, β -katenina/LEF/TCF, PAX3, Ski, Snail oraz STAT pełnią istotną rolę w rozwoju czerniaka. Wymienione czynniki transkrypcyjne zwiększają

potencjał proliferacyjny, zdolność komórek do migracji lub tworzenia przerzutów. Ponad 90% przypadków zachorowania na czerniaka wskazuje na podwyższenie aktywności kinazy Erk. Udział w jej stymulacji ma mutacja w NRAS, jednym z trzech ludzkich genów Ras. Gen ten ulega mutacji w 15–30% przypadków czerniaka skóry. Jednak najczęstszą zmianą genetyczną w czerniaku jest mutacja w *BRAF* (50–70%) skutkującą zaburzeniami w drodze sygnałowej Ras/Erk. Czynnikiem transkrypcyjnym MITF odpowiada za ekspresję genów będących markerami czerniaka [Lesiak et al. 2007]. Badania sugerują, że rola tego czynnika jest związana z jego poziomem w komórce. W prawidłowo rozwijających się melanocytach jest on wyższy niż w komórkach nowotworowych i uruchamia takie procesy jak hamowanie cyklu komórkowego nowotworu oraz jego różnicowanie. Niski poziom ekspresji stymuluje proliferację.

Z kolei czynnik transkrypcyjny NF- κ B w komórkach czerniaka indukuje ekspresję cząsteczek adhezji komórkowej, tj.: ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 i metaloprotein (np. MP-2). Cząsteczki te ułatwiają komórkom nowotworowym poruszanie się w obrębie podścieliska nowotworu. Nadają im właściwości silnie inwazyjne [Amiri et al. 2005]. Następnie indukuje ekspresję białek zaangażowanych w procesy neowaskularyzacji guza, m.in. chemokin CXCL8/IL8 i CXCL1/MGSA, metaloproteinazy MMP-2 oraz cytokiny VEGF. Istotną rolę w transformacji nowotworowej pełni również czynnik transkrypcyjny Notch. Eksperymenty na myszach dotyczące delekcji tego genu w komórkach naskórka sugerują powstawanie hiperplazji naskórkowej oraz rozwoju czerniaka. Notch wpływa na proliferację, żywotność komórek nowotworu, a także powstawanie przerzutów. Progresja czerniaka jest wywoływana m.in. poprzez inicjację ekspresji białek np. N-kadheryna [Lesiak et al. 2007].

Geny, uczestniczące w powstawaniu mutacji i onkogenezie, obejmują procesy replikacji i naprawy DNA oraz związane są z chromosomową segregacją i apoptozą. W większości komórek nowotworowych mamy do czynienia z klonalnymi mutacjami, które są jednym z wielu celów terapii przeciwnowotworowych, jako te ułatwiające rozrost guza. Z kolei losowe mutacje mogą opóźnić wzrost nowotworu poprzez wywoływanie silnych odpowiedzi immunologicznych lub procesu starzenia, dlatego również są wykorzystywane w poszukiwaniu skutecznej immunoterapii.

W przeciwieństwie do silnej nadwrażliwości chemicznie indukowanych guzów, spontanicznie powstające nowotwory są słabo immunogenne [Hewitt et al. 1976].

Odpowiedź immunologiczna przy tych guzach jest kierowana przeciwko słabo immunogennym, wspólnym, własnym antygenom [Turk et al. 2004]. Eksperymenty molekularne wykazują, że antygeny specyficzne dla guzów u myszy i ludzi mogą powstawać z własnych, zmutowanych białek i być rozpoznawane przez limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺. Mutacje te powodują zwiększenie powinowactwa receptorów TCR do ligandów prezentowanych przez komórki nowotworowe, co skutkuje ich aktywacją [Guevara-Patino et al. 2006, Duan et al. 2009].

Badania nad szczepionkami, które miałyby na celu prewencję i skuteczną terapię czerniaka złośliwego, trwają już od 30 lat. Wraz z rozwojem wiedzy na temat ludzkiego układu immunologicznego i nowotworów, naukowcy są coraz bliżej ich uzyskania. Historycznie pierwszym ludzkim antygenem rozpoznawanym przez komórki T uznano antygen raka jądra, który sklonowano w 1991 r. i nazwano „MAGE”. Najbardziej popularnymi antygenami używanymi do produkcji szczepionek czerniakowych zaliczono: MAGE 1, MAGE 3, MART-1, BAGE, GAGE, CAGE, XAGE, tyrozynaza, gp100 i NY-ESO-1. MAGE-1 i MAGE 3 prezentowane są z ludzkimi antygenami zgodności tkankowej HLA-A1, natomiast antygeny MART-1, tyrozynaza czy gp100 w połączeniu z ludzkimi antygenami HLA-A2 [Hodi, 2006; Parmiani, 2001]. Wyróżniamy następujące typy szczepionek:

- najstarsze szczepionki czerniaka wykorzystują całe komórki guza. W przypadku szczepionek antygenowych komórki czerniaka transfekuje się określonymi genami, których ekspresja powoduje pojawianie się na powierzchni antygenów białkowych wywołujących odpowiedź immunologiczną [Schmidt, 2009],
- szczepionki autologiczne zawierają komórki pochodzące z guza pacjenta. Zawierają unikalny zestaw antygenów, powstałych na skutek mutacji. Szczepionki autologiczne odpowiadają pod kątem HLA pacjenta, dzięki czemu otrzymujemy optymalną prezentację antygenów przez limfocyty T. Wadą układu jest zbyt mała ilość komórek guza pierwotnego, niewystarczająca do wykonania odpowiedniej liczby szczepionek [Sondak et al. 2006],
- szczepionki allogeniczne zawierają niezmienione lub modyfikowane komórki czerniaka pochodzące od innych pacjentów wyselekcjonowanych pod kątem posiadania antygenów spotykanych na dużym odsetku czerniaków. Dostępne

są dla pacjentów ze wszystkimi stadiami zaawansowania czerniaka. Wadą może być brak rzadkich i unikalnych antygenów, kluczowych w odpowiedzi immunologicznej u konkretnego pacjenta [Sondak et al. 2006],

- szczepionki terapeutyczne, które wykorzystują peptydy o długości 8-10 aminokwasów, uzyskane z specyficznych antygenów znajdujących się na powierzchni komórek czerniaka [Schadendorf, 2009],
- szczepionki DNA podawane są podskórnie lub domięśniowo. Wprowadzony zostaje plazmid zawierający gen kodujący białko antygenowe. Plazmid zostaje pochwycony przez komórki gospodarza, które produkują pożądane białko. Białkowe fragmenty antygenów prezentowane są limfocytom T i w konsekwencji następuje indukcja odpowiedzi komórkowej i humoralnej [Yuan et al. 2009].

Na podstawie aktualnej wiedzy uważa się, że onkogeneza jest inicjowana w zdrowych komórkach macierzystych danej tkanki lub komórkach progenitorowych, różnicujących się z komórek macierzystych. Zgodnie z teorią somatycznych mutacji, kancerogeneza związana jest z nagromadzeniem się zmian w obrębie DNA. Przejście zdrowej komórki w nowotworową jest wynikiem zajścia mutacji na poziomie genetycznym i uzyskaniem zdolności do wielokrotnych, niekontrolowanych podziałów, co daje początek nowotworzeniu. Tak zmieniona komórka przypomina komórkę macierzystą [Salama et al. 2009]

1.2. Rola limfocytów T w swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej

Swoista odpowiedź przeciwnowotworowa opiera się na precyzyjnym, antygenowo specyficznym rozpoznaniu a następnie usuwaniu czynników chorobotwórczych. Zapewnia uzyskanie pamięci immunologicznej. Receptory, które rozpoznają antygeny zostają wyselekcjonowane (selekcja klonalna) i amplifikowane podczas reakcji odpornościowej każdej pierwotnej infekcji. W celu rozwinięcia odpowiedzi swoistej niezbędne jest pojawienie się mechanizmów odpowiedzi nieswoistej. Odpowiedź swoista składa się z trzech etapów: rozpoznania antygeny, generacji swoistych

komórek immunokompetentnych oraz fazy efektorowej prowadzącej do zniszczenia antygeny. Możemy ją podzielić na odpowiedź humoralną i komórkową.

Odpowiedź przeciwnowotworowa obejmuje wiele typów komórek organizmu. Zaliczamy do nich przeciwciała, limfocyty cytotoksyczne skierowane przeciwko komórkom nowotworowym, limfocyty regulatorowe, które w środowisku guza mogą hamować działanie ze strony układu immunologicznego i wiele innych. Ten typ odpowiedzi wskazuje na obecność TAA (antygenów związanych z nowotworem), będących często celem immunoterapii. Występowanie ich w większości na komórkach nowotworu jest spontaniczne i nieswoiste, ponieważ powszechnie są obecne na komórkach prawidłowych. Zaliczamy do nich także antygeny komórek powstających podczas rozwoju embrionalnego (normalnie nie występujące u dorosłych) oraz związane z nowotworem antygeny wirusowe. Z kolei antygeny występujące na komórkach prawidłowych i nowotworowych, z których wywodzi się guz, określane są jako antygeny różnicowania. Ostatnią grupę stanowią unikalne, antygeny TSA (swoiste dla nowotworu), obecne tylko na jego komórkach [Lu YC, Robbins, 2016].

Niniejsza rozprawa doktorska skupia się przede wszystkim na odpowiedzi przeciwnowotworowej typu komórkowego. Rolę obronną pełnią bezpośrednio uczulone komórki (limfocyty i makrofagi) oraz produkowane przez nie cytokiny. Komórki pochłaniają antygen, a po rozłożeniu prezentują na swojej powierzchni. Limfocyt T, który rozpozna antygen ulega aktywacji, następnie proliferacji i dojrzewaniu jego klonów zdolnych do odpowiedzi. Dochodzi do fagocytozy z udziałem makrofagów lub generacji swoistych komórek cytotoksycznych CD8⁺ i CD4⁺, które uruchamiają program apoptozy w komórce docelowej [Żeromski, 2000]. Takie działania są ściśle zależne od cząsteczek MHC klasy I i klasy II, uczestniczących w prezentowaniu limfocytom T obcych, oraz związanych z procesem nowotworzenia antygenów. Wśród możliwych typów reakcji na rozwijający się nowotwór wyróżniamy m.in.:

- zdolność limfocytów do odpowiedzi cytotoksycznej zależnej od przeciwciał,
- cytotoksyczność limfocytów T_c,
- wydzielanie cytokin przez limfocyty T np. interleukiny, interferony, chemokiny czy nadrodzina TNF,

- aktywacja komórek NK,
- swoiste rozpoznawanie TAA przez limfocyty Th w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II. W wyniku aktywacji komórek Th następuje wydzielanie cytokin i aktywacja odpowiedzi immunologicznej [Gołąb et al. 2005].

Najważniejszymi komórkami układu odpornościowego są limfocyty B i T biorące udział w odpowiedzi komórkowej oraz komórki APC (prezentujące antygen). Ludzki organizm posiada ok. 10^{12} mln limfocytów, mających duże jądra o zróżnicowanej wielkości. Limfocyty B powstają w szpiku kostnym. Zaś prekursorzy limfocytów T migrują do grasicy, gdzie następuje proces edukacji grasiczej czyli dojrzewania.

Grasica jest centralnym narządem limfatycznym spełniającym rolę namnażania i różnicowania limfocytów T w komórki pomocnicze, cytotoksyczne, regulatorowe. Komórki nabierają kompetencji immunologicznej w wyniku selekcji klonalnej. Edukacja grasicza zapewnia rozwijającym się komórkom tolerancję wobec własnych tkanek. Wykształca się populacja, która na swojej powierzchni komórkowej formuje receptor TCR zdolny do rozpoznawania peptydów o niskim/ średnim stopniu powinowactwa. Limfocyty wiążące peptyd z wysokim powinowactwem są usuwane jako te, które są zdolne do wywołania autoagresji [Gołąb et al. 2005].

1.2.1. Limfocyty T cytotoksyczne

Subpopulacja limfocytów o właściwościach cytotoksycznych tzn. zabijających inne komórki obejmuje następujące grupy komórek: limfocyty T $\alpha\beta$ CD8⁺, T $\alpha\beta$ CD4⁺ subpopulację Th1, limfocyty T $\gamma\delta$.

Główną rolą limfocytów CD8⁺ jest niszczenie komórek zakażonych przez mikroorganizmy: bakterie, wirusy, grzyby oraz zmienione nowotworowo komórki własnego organizmu. Zabijają komórki rozpoznające obce cząsteczki MHC klasy II lub antygeny połączone z własnymi cząsteczkami MHC klasy I wykorzystują w tym celu dwie drogi. Pierwszą jest indukcja apoptozy zależnej od uwalniania perforyn, granzymów, granulizyny. Drugą jest indukcja apoptozy zależnej od interakcji cząsteczek w błonie komórek efektorowych i błonie komórek docelowych tj. Apo-1L/FasL (CD95), TNF, limfotoksyna α , TRAIL. Podczas interakcji cząsteczek Fas i FasL potrafią uśmiercać same siebie, jak również inne pobudzone komórki B i T,

usuając tym samym limfocyty autoreaktywne. W przypadku odpowiedzi przeciwnowotworowej limfocyty Tc obecne w narządach limfatycznych oraz w samej masie guzowej w dużej ilości, są związane z dobrą prognozą dla pacjenta [Zammaron et al. 2011]. Dane eksperymentalne zawarte w tej pracy potwierdzają przedstawione powyżej wnioski. Myszy, które rozwinęły mniejsze guzy miały zdecydowanie większy odsetek limfocytów cytotoksycznych infiltrujących guz niż te o większych guzach.

1.2.2. Limfocyty Th pomocnicze

Limfocyty Th CD4⁺ pełnią funkcje pomocnicze w prawidłowym funkcjonowaniu układu immunologicznego. Mają zadanie wspomaganie odpowiedzi typu humoralnego oraz komórkowego poprzez bezpośredni kontakt oraz wytwarzanie cytokin. Uczestniczą w aktywacji, proliferacji i różnicowaniu komórek B oraz prekursorów cytotoksycznych limfocytów T. Odpowiadają za aktywację makrofagów i regulację ich funkcji. W zależności od cytokin obecnych w środowisku oraz siły sygnału przekazywanego przez TCR, limfocyty różnicują się w kierunku subpopulacji Th1, Th2, Th17 i Th3 [Zhu, et al. 2010, Ariga et al. 2007]. Dojrzałe limfocyty Th po opuszczeniu grasicy przechodzą trzy etapy rozwoju. W pierwszej kolejności wydzielają głównie IL-2, potem m.in. IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ oraz GM-CSF. Długotrwała stymulacja antygenem powoduje różnicowanie się limfocytów Th1 i Th2 przy obecnych na ich powierzchni cząsteczkach CD28 i OX40 [Rengarajan et al. 2000].

Populacja komórek Th 1 powstaje przy aktywności czynnika transkrypcyjnego T-bet oraz Stat-1/Stat-4, w wyniku wydzielania przez komórki NK takich cytokin jak IL-12 oraz IFN- γ . Ma na celu głównie wspomaganie odpowiedzi typu komórkowego, hamowanie infekcji wirusowych i bakteryjnych. Zaktywowane komórki Th 1 dzięki produkcji IFN- γ i wiązaniu cząsteczki CD40 aktywują makrofagi. Wywołują nadekspresję MHC klasy I i II, co w efekcie powoduje zwiększenie prezentacji antygenów limfocytom cytotoksycznym, głównie dzięki wytwarzaniu IL-2. Z kolei populacja komórek Th 2 powstaje w wyniku aktywności czynnika transkrypcyjnego GATA-3 oraz Stat-6. Limfocyty Th 2 produkują IL-4, IL-5, IL-10 oraz IL-13. Ich główną rolę jest przekazywanie sygnału do aktywacji i różnicowania komórek B. Jest to możliwe dzięki rozpoznawaniu na ich powierzchni kompleksu MHC-peptyd

[Szabo et al. 2000, Rengarajan et al. 2000, Afkarian et al. 2002, Zheng et al. 1997, Perona-Wright et al. 2010].

Limfocyty pomocnicze poprzez produkcję odpowiednich cytokin, wykorzystują efekty sprzężenia zwrotnego dodatniego. Różnicują się z poziomu dziewiczych komórek T, które w obecności IL-4 przechodzą w kierunku komórek Th 2, a w obecności INF- γ w stronę Th 1 [Swain et al. 1990]. Krzyżowa regulacja powstawania limfocytów Th zachodzi dzięki wpływowi cytokin. Wydzielany przez komórki Th 1 INF- γ hamuje proliferację i czynność limfocytów Th 2, natomiast IL-10 wydzielana przez Th 2 hamuje produkcję cytokin przez Th 1. Również obecność TGF- β działa hamująco na różnicowanie się komórek Th 1 i Th 2, przez obniżanie ekspresji T-bet i GATA-3 [Li, M.O., et al. 2006].

Głównym mechanizmem wykorzystywanym przez komórki pomocnicze jest swoiste rozpoznawanie antygenów nowotworowych. Następstwem tego działania jest ich aktywacja i wydzielanie cytokin. Cytokiny takie jak IL-4, IL-5, IL-6 wspomagają syntezę przeciwciał wytwarzanych przez limfocyty B. Z kolei do zabijania komórek nowotworowych INF- γ aktywuje makrofagi a IL-2 komórki NK oraz limfocyty Tc. Limfocyty Th potrafią zabijać komórki nowotworowe jak również hamować ich proliferację za pomocą TNF oraz limfotoksyn [Nakayamada et al. 2012].

1.2.3. Limfocyty T regulatorowe

Populacja komórek regulatorowych po raz pierwszy zaobserwowana została w latach 60-tych. Gershon i współpracownicy wskazali na obecność supresorowych limfocytów T, regulujących antygenowo specyficzną odpowiedź immunologiczną [Gershon et al. 1970]. Eksperymenty na mysich noworodkach, u których po 3 dniach życia usunięto grasice ujawniły rozwinięcie się szeregu chorób autoimmunizacyjnych [Nishizuka et al. 1969]. W 1995 roku Sakagouchi i współpracownicy zidentyfikowali pośród limfocytów CD4⁺ niewielką populację komórek, posiadającą na swojej powierzchni cząsteczki CD25 i pełniącą funkcje supresorowe. Ich usunięcie z mysiego organizmu sprzyja rozwojowi kaskady chorób autoimmunologicznych. Z kolei transfer zidentyfikowanej populacji ze zdrowej myszy do osobnika pozbawionego ich eksperymentalnie, wpływa hamująco na rozwój choroby [Sakaguchi et al. 1995, Suri-Payer et al. 1998].

Początkowo uważano je za komórki anergiczne. Jednakże, okazało się, że limfocyty Treg proliferują nie tylko *in vivo* ale również przy odpowiednich warunków hodowli, *in vitro* [Choraży-Massalska et al., 2006].

Wyróżnia się 2 rodzaje limfocytów regulatorowych: tT reg (naturalne limfocyty regulatorowe), które powstają w grasicy oraz iT reg (indukowane limfocyty regulatorowe). Indukowane T reg rozwijają się z naiwnych limfocytów T, zasiedlających obwodowe narządy limfoidalne w odpowiedzi na antygen, w warunkach tolerancji immunologicznej. Powstają wskutek konwersji komórek CD4⁺FoxP3⁻ do CD4⁺FoxP3⁺, w wyniku aktywacji receptora TCR w obecności TGF-β, kwasu retinowego (metabolitu witaminy A) oraz IL-2 [Coombes et al. 2007, Curotto de Lafaille et al. 2008, Liu et al. 2007]. W obecności IL-6 następuje zahamowanie tego procesu i różnicowanie się naiwnych komórek T w prozapalne komórki Th 17 [Sakaguchi et al. 2007].

Obie subpopulacje ekspresjonują czynnik transkrypcyjny FoxP3, odpowiedzialny za supresorowe funkcje T reg. Foxp3 jest nadrzędnym regulatorem rozwoju grasiczych komórek T reg oraz niezbędny do indukcji iT reg z konwencjonalnych komórek CD4⁺CD25⁻ [Hegazy et al. 2010; Karim et al. 2004; Masatsugu Oh-hora and Anjana Rao et al. 2009]. Jest regulowany przez takie czynniki transkrypcyjne jak STAT 5, Smad 3, NFAT. Uważa się, że jest markerem umożliwiającą precyzyjną identyfikację tej populacji [Hori et al. 2009; Fontenot et al. 2003]. Mutacja genu Foxp3 wywołuje wielonarządowe choroby autoimmunizacyjne u ludzi, czyli zespół immunodysregulacyjny sprzężony z chromosomem X, z poliendokrynopatią i enteropatią (IPEX: immunodysregulation, polyendocrinolopathy, enteropathy, X-linked syndrome) u myszy (mysia linia *scurfy*) [Williams et al. 2007]. Główną grupę zaburzeń stanowią: enteropatia, zapalenie tarczycy, insulinozależna cukrzyca typu I, niedokrwistość hemolityczna [Gołąb et al. 2014]. Zhou i współpracownicy zbadali stabilność T reg poprzez śledzenie komórek, u których następowało podwyższenie poziomu ekspresji Foxp3 oraz komórek, u których następowało jego obniżenie podczas swojego życia. Odkryto, że komórki, które ekspresjonują ten czynnik a następnie go straciły, współdzielą receptor TCR zarówno z naturalnymi komórkami regulatorowymi jak i z konwencjonalnymi limfocytami T sugerując, że pochodzą one z nT reg i iT reg. „ex T reg” posiadają zaktywowany fenotyp i produkują cytokiny prozapalne. Przeprowadzone eksperymenty wskazują, że mikrośrodowisko

na poziomie rozwoju choroby autoimmunologicznej sprzyja utracie Foxp3 a tzw. ex T reg są w stanie indukować cukrzycę [Zhou et al. 2009]. Z kolei inne badania dowodzą, że część obwodowych komórek CD4⁺Foxp3⁺ traci zdolność do ekspresji Foxp3 i zaczyna produkować IFN- γ oraz IL-17, po przeniesieniu do limfopenicznego gospodarza [Komatsu et al. 2009].

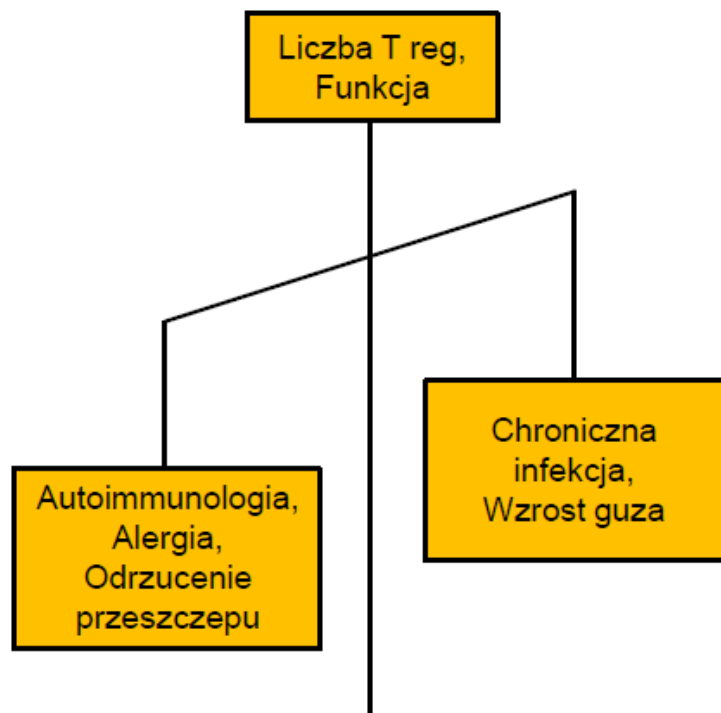
Odkrycie czynnika transkrypcyjnego Foxp3 ujawniło 2 główne różnice między mysimi a ludzkimi komórkami T reg. U ludzi, naiwne komórki T pod wpływem stymulacji receptora TCR ekspresjonują niskie lub przejściowe poziomy Foxp3. Nie obserwuje się takiej sytuacji u myszy. Ponadto, poziom ekspresji CD25 i Foxp3 koreluje w mysich limfocytach regulatorowych (90% komórek CD25⁺ posiada fenotyp Foxp3). Ten fakt pozwala na efektywne izolowanie z myszy tych komórek (CD25^{high+}). W przeciwieństwie do ludzkich komórek Foxp3⁺ T reg mogą posiadać ekspresję CD25 na poziomie wysokim lub pośrednim, oraz cząsteczkę CD25 ekspresjonują również aktywowane komórki T. Komórki regulatorowe ekspresjonują panel cząsteczek kostymulatorowych i hamujących (CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1), grupę molekuł TNF receptor super family (TNFRSF) tj. TNFR2, GITR, OX40, 4-1BB, FAS, chemokinowe receptory (CCR2, -4, -5, -6, -7 i -8, CXCR3 oraz -4) oraz TLRy (TLR1, -2, -4, -5, -6, -7, -8 -9) [Chen Xin et al. 2011]. Człowiek posiada populację komórek regulatorowych, która podobnie jak u myszy stanowi 10% populacji limfocytów CD4⁺ o aktualnie przyjętym fenotypie: CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺ GITR⁺ FoxP3⁺ CD45RO⁺ CD45RA⁻CD69⁻ Ki-67⁻ [Betts et al. 2006]. Funkcją komórek regulatorowych jest:

- wpływ na modulację odpowiedzi immunologicznej całego organizmu, utrzymanie tolerancji dla własnych antygenów (ochrona przed chorobami autoimmunizacyjnymi),
- uczestnictwo w procesach hamowania/ regulowania odpowiedzi immunologicznej przy przeszczepach, chorobach nowotworowych oraz chorobach wywołanych przez drobnoustroje [Wing et al. 2006],
- są odpowiedzialne za hamowanie aktywności T ef (efektorowych limfocytów T) skierowanych przeciwko własnym tkankom, w obecności komórek dendrytycznych, co w praktyce przyczynia się niejednokrotnie do braku skutecznej odpowiedzi immunologicznej np. przeciwko nowotworom,

- hamują aktywację, proliferację i różnicowanie, m.in. limfocytów B, CD4⁺ i CD8⁺, komórek NK, NKT, monocytów,
- zapobiegają reakcjom autoimmunizacji i nadwrażliwości,
- w utrzymaniu tolerancji na antygeny podane doustnie,
- w zapobieganiu eliminacji bakterii komensalnych przez układ odpornościowy,
- w ochronie płodu przed odrzuceniem przez układ odpornościowy matki [Schmidt et al. 2012].

Aktywowane komórki T_{reg} zarówno naturalne jak i indukowane wymagają antygenowo swoistego sygnału TCR. Z kolei funkcja hamowania wymaga kontaktu komórkowego [Thornton et al. 2000, Thornton et al. 1998]. Limfocyty iT_{reg} odpowiadają za zjawisko tolerancji potransplantacyjnej. W miejscu toczącego się procesu zapalnego hamują uszkodzającą tkanki odpowiedź immunologiczną [Long et al. 2007]. Komórki iT_{reg} znajdują się w przewarżającej większości w tkance limfatycznej związanej z błonami śluzowymi jelit oraz dróg oddechowych, ze względu na stałą ekspozycję na obce antygeny bakteryjne i wirusowe [Bilate et al. 2012].

Wykazano, że cząsteczka CD28 w pierwszym etapie edukacji grasiczej odgrywa ważną rolę w różnicowaniu komórek regulatorowych poprzez motyw PYAP, który jest odpowiedzialny za aktywację szlaku NF-κB, a w szczególności czynnika c-Rel [Vang et al. 2010]. Przy próbie aktywacji *in vitro* (stymulacja receptora TCR i ko-receptora CD28) możemy zaobserwować, charakterystyczne dla tej populacji komórek, zjawisko anergii. Zewnętrzne dostarczenie IL-2, która jest niezbędna do przeżycia T_{reg}, przełamuje ten stan i zapewnia prawidłowy wzrost komórek [Papiernik et al. 1998, Setoguchi et al. 2005]. Komórki regulatorowe nie produkują tej interleukiny, ale dzięki ekspresji CD25 (łańcuch α receptora dla IL-2) możliwe jest jej wiązanie.



Ryc 3. Schemat zależności poziomu komórek T reg na rozwój chorób (Shalew et al. 2011).

Zmniejszenie liczby komórek T reg lub ich aktywności prowadzi do rozwoju chorób autoimmunologicznych, alergii i odrzucenia przeszczepu. Z kolei zaburzenia ilościowe komórek T reg lub ich nieprawidłowa funkcja może powodować podatność na przewlekłe zakażenie i predestynują do rozwoju nowotworu (Ryc.3).

Limfocyty T reg posiadają receptory TCR, które rozpoznają zarówno własne jak i obce antygeny. Występują w stanie aktywowanym, co widać na podstawie ekspresji wysokich poziomów markerów aktywacji i cząsteczek adhezyjnych. Ogromna liczba komórek regulatorowych ulega proliferacji *in vivo*, prawdopodobnie ze względu na ich interakcje z własnymi antygenami i komensalnymi bakteriami. Stymulacja antygenem jest wymagana, aby uaktywnić hamujące działanie limfocytów T reg, jednakże raz zaktywowane, regulują odpowiedź immunologiczną w sposób antygenowo nie specyficzny [Sakaguchi et al. 2004]. Komórki regulatorowe mogą hamować *in vitro* oraz *in vivo* proliferację i aktywację różnych typów komórek odpornościowych, w tym komórek T, B, NK i NKT [Sakaguchi et al. 2007, Suvas et al. 2003]. Mechanizmy supresorowe wykorzystywane przez komórki regulatorowe to:

- udział przeciwzapalnych cytokin tj. IL-10, TGF- β , IL-35, FGL2,

- wywołanie bezpośredniego efektu cytotoksycznego dzięki obecności granzymu A/B, perforyn, TRAIL-DR5 i galektyny 1,
- wywołanie zaburzeń metabolicznych powodowanych produkcją adenozyliny i usuwaniem IL-2,
- wpływ na funkcje komórek dendrytycznych (modulacja dojrzewania komórek APC) poprzez działanie CTLA-4, LAG3, indukcjaIDO [Vignali et al. 2008].

Obecnie wiadomo, że poza komórkami tT reg, które posiadają funkcje regulatorowe, istnieje szereg innych populacji komórkowych o funkcjach supresorowych. Zaliczamy do nich: Tr 1 (komórki regulatorowe typu 1), Th 3 (komórki pomocnicze typu 3), komórki regulatorowe CD8⁺, komórki regulatorowe $\Gamma\delta$. Tr 1 Charakteryzują się niską ekspresją cząsteczek CD25^{low} oraz Foxp3^{low} [Groux et al. 1997]. Odgrywają rolę w różnych chorobach immunologicznych zarówno u myszy jak i ludzi np. zapalenie jelit. Wytwarzanie komórek Th 3 uważa się za istotne w indukcji i utrzymaniu tolerancji nie patogennych bakterii i potencjalnie immunogennych antygenów pochodzących z żywności. Th 3 aktywują się w odpowiedzi na określone antygeny, ale są tłumione w sposób antygenowo niespecyficzny, poprzez uwalnianie TGF- β . Komórki regulatorowe CD8⁺. Podczas aktywacji komórki te nie produkują cytokin, ale wytwarzają na swojej powierzchni TGF- β i CTLA-4. Populacja komórek CD8⁺CD25⁺ ulega anergii *in vitro* oraz jest w stanie hamować proliferację efektorowych komórek CD4⁺ podczas kontaktu z nimi. Hamują dziewicze komórki CD8 przy produkcji IL-10. Komórki regulatorowe $\Gamma\delta$ produkcja chemokin oraz przeciwzapalnych cytokin tj. TGF- β , IL-10, tymozyna β 4 co umożliwia regulowanie lokalnej odbudowy i dojrzewania innych komórek limfoidalnych. Innym zaproponowanym mechanizmem jest uwalnianie INF- γ przez komórki T $\gamma\delta$ [Shalew et al. 2011]

Komórki T reg prowadzą do supresji limfocytów skierowanych przeciwko TAA (większość antygenów nowotworowych jest autoantygenami). Tym samym stanowią potencjalny mechanizm wyjaśniający niepowodzenie układu immunologicznego w odpowiedzi przeciwnowotworowej [Sakaguchi et al. 2005, Curiel et al. 2004]. Curiel i wsp. dowodzą, że limfocyty T o tych samych właściwościach, ale różnej awidności, charakteryzują się różną wrażliwością na supresję wywieraną przez T reg. Tylko limfocyty z wysoką awidnością, wrażliwe na Treg, mogą brać udział w odpowiedzi przeciwnowotworowej [Curiel et al. 2004].

Z kolei ciekawym zagadnieniem związanym z obecnością T reg w masie guzowej jest mechanizm oddziaływania nowotworu na te komórki. Dowiedziono, że guzy przyciągają T reg w swoim kierunku poprzez produkcję cytokin i powodują ich miejscową ekspansję. Komórki nowotworowe produkują chemokinę CCL22, która poprzez receptor CCR4 obecny na T reg przyciąga je w kierunku stromy nowotworu. Podanie przeciwciał przeciwko chemokinie CCL22 w warunkach *in vivo* hamuje migrację Treg do przeszczepionego nowotworu [Yang et al. 2006]. Inną cząsteczką wpływającą na migrację komórek regulatorowych jest TGF β , co pokazano podczas ekspozycji niedojrzałych mieloidalnych komórek dendrytycznych na komórki nowotworowe lub rozpuszczone czynniki produkowane przez te komórki. W efekcie następowała produkcja TGF β , który stymulował ekspansję Treg oraz zwiększał ich aktywność *in vivo* [Ghiringhelli et al. 2005]. Tego typu badania prowadzące do zahamowania aktywności Treg w mikrośrodowisku guza może stać się podstawą do opracowania nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej.

1.2.4. Limfocyty T γ / δ

Komórki T $\gamma\delta$ (gamma/ delta) należą do populacji limfocytów T ekspresjonujących unikalny receptor TCR składający się z jednego łańcucha γ oraz jednego łańcucha δ . Występują we krwi obwodowej na poziomie 1-10% oraz 0,2-0,9% ludzkich tymocytów. Ich duże natężenie znajduje się w błonie śluzowej jelit, skórze, płucach, macicy. Rozwój limfocytów T $\gamma\delta$ (powstają jako pierwsze w grasicy), podobnie jak komórek T $\alpha\beta$ w początkowych etapach jest wspólne. Są początkowo monomorficzne i zasiedlają fałdami tkanki obwodowe. Mogą powstawać także w błonach śluzowych przewodu pokarmowego, z komórek progenitorowych mających antygen Kit. Biorą udział w inicjacji i propagacji odpowiedzi immunologicznych przeciwko wirusom, bakteriom, pierwotniakom oraz w odpowiedzi przeciwnowotworowej [Haks et al. 2005]. Podobnie jak limfocyty T cytotoksyczne, wydzielają cytokiny. Ich umiejętność rozpoznawania antygenów nie jest związana ani z udziałem komórek prezentujących antygen ani z cząsteczkami MHC np. podawanie antygeny w postaci aerozolu drogą donosową powoduje ich indukcję i wytwarzanie IL-10 o działaniu immunosupresyjnym. Ze względu na niewielką zmienność receptorów tych komórek, rozpoznają małą pulę powszechnie występujących antygenów. Większość populacji tych limfocytów posiada

fenotyp CD2⁺3⁺4⁺8⁻. Nieliczne posiadają markery CD4⁺ lub CD8⁺. Limfocyty T $\gamma\delta$ podobnie jak komórki NKT wykazują niezależnie od restrykcji MHC, cytotoksyczność względem komórek nowotworowych oraz cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał [Hayes et al. 2005]

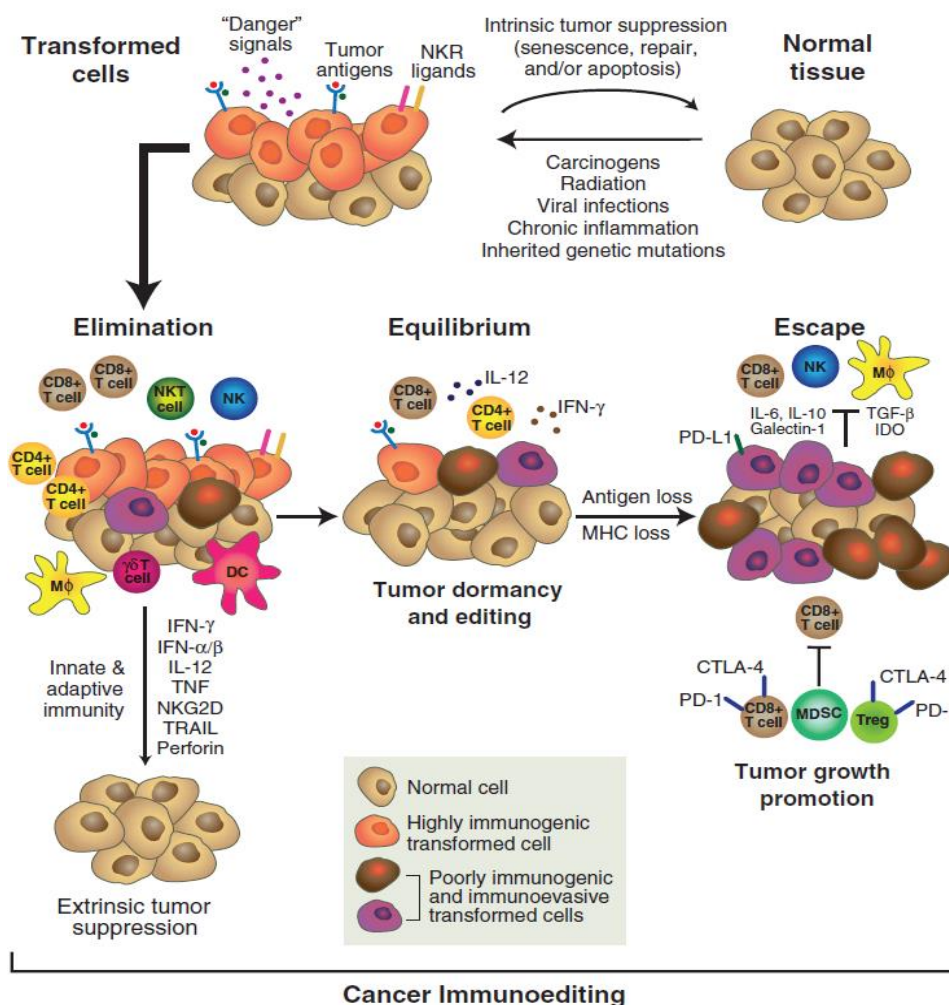
1.3. Immunoedytowanie

W 1863 roku pojawiły się pierwsze wzmianki naukowe na temat obserwacji nacieków leukocytnych w guzach nowotworowych. Ich odkrywca Rudolf Virchow wskazał na istnienie silnej korelacji pomiędzy nimi a stopniem ułłośliwienia nowotworu. Teza ta uległa wzmocnieniu po wykazaniu istnienia antygenów nowotworowych. Paul Ehrlich sformułował teorię nadzoru immunologicznego nad nowotworem, którą potwierdzono na początku XXI wieku. W 2004 roku Dunn i wsp. zaproponowali tezę „immunoedycji” układu odpornościowego [Dunn et al. 2004].

Zgodnie z teorią powiązania pomiędzy nowotworem a układem odpornościowym guzy są bardzo plastyczne i rozwijają się w kilku etapach. Uważa się, że układ odpornościowy odpowiada za trzy główne funkcje w zapobieganiu chorobom nowotworowym: chroni przed infekcjami wirusowymi indukującymi nowotwory wywoływane przez wirusy; zapobiega rozwojowi stanu zapalnego, który ułatwia powstawanie guzów; eliminuje komórki nowotworowe z tkanek dzięki obecności rozpoznawanych antygenów [Schreiber et al. 2011].

Początek procesu nowotworzenia to etap kompleksowych interakcji pomiędzy nowotworem a otaczającą tkanką, która staje się mikrośrodowiskiem nowotworu. Powstają wzajemne relacje pomiędzy komórkami nowotworu a komórkami odporności wrodzonej i nabytej, które chronią organizm przed rozwojem guza, ale też kształtują jego immunogenność, działając promująco na jego wzrost. Wydzielanie przez komórki nowotworowe czynników immunosupresyjnych powoduje wygaszanie odpowiedzi immunologicznej ze strony układu odpornościowego. Teoria immunoeditingu wskazuje na mechanizmy zewnętrznego supresorowego działania nowotworowego, uaktywniającego się po przejściu przez komórki prawidłowe transformacji komórkowej oraz mechanizmy supresorowego, wewnętrznego działania nowotworów, które nie

zostały stłumione przez organizm. Koncepcja immunoedingu obejmuje 3 fazy: eliminacji, równowagi, uciezki (Ryc. 4).



Ryc 4. Teoria immunoedingu nowotworów (Schreiber et al. 2011).

Podczas pierwszej fazy, **ELIMINACJI**, układ immunologiczny wrodzony i nabyty współpracują ze sobą i niszczą komórki nowotworowe. Pobudzenie jest wywoływane uszkodzeniami genetycznymi komórek ulegających nowotworzeniu. Powstaje odpowiedź układu określana jako nadzór immunologiczny. Na tym etapie brak klinicznych objawów wskazuje, że układ odpornościowy likwiduje uszkodzone komórki, uwalniając organizm od choroby [Jacek et al. 2009].

Mechanizmy, za pomocą których system immunologiczny jest w stanie dostrzec obecność rozwijającego się guza nie są w pełni poznane. Pośród możliwych działań wyróżniamy klasyczne "sygnały ostrzegawcze", takie jak pojawienie się interferonu

typu I (IFN- α/β) indukowanego na wczesnym etapie pojawienia się guza. Aktywuje komórki dendrytyczne i promuje indukcję przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Badania wskazują, że IFN typu I działa na komórki T CD8 α / CD103⁺ DC, w celu zwiększenia prezentacji krzyżowych do komórek T CD8⁺ [Fuentes et al. 2011, Mittal et al. 2014]. Inne cząsteczki występujące w tej fazie immunoedycji to IFN- γ , perforyny, Fas / FasL, TRAIL oraz NKG2D. Pozbawienie myszy wpływu IFN- γ , komórek T, B, NK czy NKT wywołuje spontaniczne tworzenie się guza pierwotnego. Endogennie produkowany IFN- γ zapewnia ochronę gospodarzowi przeciwko przeszczepialnym i indukowanym chemicznie spontanicznym nowotworom oraz odgrywa ważną rolę w rozpoznawaniu komórek nowotworowych i ich eliminacji. Inne ważne czynniki zaangażowane w nadzór immunologiczny to perforyny. Odpowiadają za cytotoksyczność komórkową limfocytów T, NK oraz wykorzystują proces egzocytozy i Fas/FasL, które odpowiadają za indukowaną aktywację śmierci komórkowej.

Wzajemne oddziaływanie pomiędzy tymi systemami umożliwia kontrolowanie choroby nowotworowej. Mutacje takie jak aneuploidia, tetraploidia wpływają na proces onkogenezy, zwiększają immunogenność komórek nowotworowych, co w efekcie prowadzi do ich eliminacji przez układ immunologiczny. Komórki hiperploidalne wykazują konstytutywnie aktywną odpowiedź na stres retikulum endoplazmatycznego. W efekcie następuje nieprawidłowa ekspozycja kalretikulin obecnej na powierzchni komórek i tym samym zwiększa się immunogenność komórek nowotworowych [Ryungsa et al. 2007].

W pierwszej fazie immunoedycji mamy do czynienia z mechanizmami opierającymi się głównie na wrodzonym układzie immunologicznym tj. komórkach NK czy makrofagach. Badania na mysim modelu raka wątroby wskazują rolę komórek NK w eliminacji starzejących się komórek nowotworowych, która jest zależna od wewnętrznej ekspresji białka p53. Pod wpływem p53 komórki nowotworowe starzeją się i wydzielają różne interleukiny (IL-6, IL-12 i IL-15), chemokiny (np. CCL2), co powoduje rekrutację komórek NK. Komórki NK eliminują guz poprzez ligandy NKG2D ekspresjonowane przez jego komórki. Z kolei ligandy NKG2D można indukować w komórkach nowotworowych przez różne bodźce np. sygnałowy Ras czy w odpowiedzi na uszkodzenie DNA [Gasser et al. 2005].

Wśród limfocytów T zarówno komórki T $\alpha\beta$ jak i T $\gamma\delta$ wzmacniają rolę nadzoru immunologicznego na różnych etapach progresji nowotworu. Limfocyty T $\gamma\delta$ mają wpływ na hamowanie guza we wczesnej fazie. T $\alpha\beta$ bezpośrednio hamują progresję nowotworu i zabijają go. Odkrycie z 2001 roku wskazują, że układ immunologiczny kontroluje nie tylko ilość powstających guzów, ale również ich immunogenność, co skłoniło badaczy do rewizji hipotezy nadzoru immunologicznego. Badanie to ujawniło, że guzy tworzące się u myszy, które miały naruszony układ odpornościowy, jako grupa eksperymentalna, były bardziej immunogenne (zostały sklasyfikowane jako "unedited") niż podobne nowotwory pochodzące od immunokompetentnych myszy (zostały nazwane "edited") [Shankaran et al. 2011; Dunn et al. 2002].

Wraz z długotrwałą presją selekcyjną wywieraną przez powyżej opisane mechanizmy nadzoru immunologicznego może nastąpić drugi etap immunoedycji i przejście nowotworu w **STAN RÓWNOWAGI**. W tym czasie guz, w sprzyjającym mu mikrośrodowisku tkankowym, kontynuuje podziały. Obrona organizmu i niszczenie jego komórek, jest nieskuteczna. Mechanizmy immunologiczne a zwłaszcza odporności nabytej działają na korzyść guza. Wpływ IL-12, INF- γ , komórek T utrzymuje nowotwór pod kontrolą, w stanie spoczynku funkcyjnego. IL-12 propaguje etap eliminacji z kolei IL-23 promuje przeżycie guza, co w efekcie powoduje utrzymanie nowotworu w równowadze [Ryungsa et al. 2007].

Powstaje równowaga immunologiczna, a wraz z nią, następuje edycja nowotworowej immunogenności. Badania dotyczące tej fazy wskazują na wysoki udział komórek T CD8⁺, NK, T $\gamma\delta$ i małej zawartości komórek NKT, T reg [Wu et al. 2013]. Przy braku klinicznych objawów choroby, etap ten może trwać przez całe życie gospodarza. Innym scenariuszem może być przejście nowotworu w fazę ucieczki i blokada rozregulowanego układu odporności. Niestabilność genetyczna komórek guza może czynić go niewidzialnym dla układu immunologicznego, niewrażliwym na immunologiczne mechanizmy efektorowe lub wywołanie stanu immunosupresyjnego w mikrośrodowisku. W następstwie skoordynowanej interakcji między IFN- γ i TNF zachodzi zatrzymanie wzrostu guza w fazie G1/G0 cyklu komórkowego. W przypadku nieobecności tych cząsteczek, te same komórki promują angiogenezę i wielostopniowe nowotworzenie ([Ryungsa et al. 2007].

Faza **UCIECZKI** jest to etap, w którym obecność nowotworu staje się zauważalna, wywołuje szereg objawów chorobowych. Ucieczka może nastąpić w wyniku takich mechanizmów jak:

- zmniejszone rozpoznawanie immunologiczne (np. brak silnych antygenów nowotworowych, utrata cząsteczki MHC klasy I, cząsteczek kostymulujących),
- zwiększona oporność lub przeżywalność (np. zwiększona ekspresja STAT-3 lub anti-apoptotycznej cząsteczki BCL2) lub
- rozwój immunosupresyjnego mikrośrodowiska nowotworu (cytokiny, takie jak VEGF, TGF- β ; immunoregulatorowe cząsteczki, takie jakIDO, PD-1 / PD-L1, Tim-3 / galektyny -9 LGD-3) [Teng et al. 2015].

Mechanizm ucieczki immunologicznej nowotworu i opracowanie skutecznych sposobów walki z nią jest nadal zagadnieniem do odkrycia przez współczesną naukę. Wprowadzenie do badań modeli myszy transgenicznych o wrodzonym niedoborze odporności umożliwiło obserwację zjawisk sprzyjających progresji nowotworów jak również mechanizmów biorących udział w jego powstrzymaniu.

1.4. Centralna i obwodowa tolerancja immunologiczna a immunogenność nowotworu

Prawidłowe rozpoznawanie i eliminacja obcych antygenów przez układ odpornościowy to skuteczna walka nie tylko z mikroorganizmami, ale także z komórkami nowotworowymi. Dzięki różnorodności receptorów TCR (limfocyty T) oraz receptorów immunoglobulinowych BCR (limfocyty B) uruchomiony zostaje szereg mechanizmów umożliwiających usunięcie komórek rozpoznających antygeny własne, czyli autoreaktywne lub ich „wyciszenie” na drodze tolerancji. Indukcja tolerancji może odbywać się poprzez:

- anergię allospecyficznych limfocytów T,
- blokadę kostymulacji,
- allopeptydy oderwane od cząstek MHC klasy I,
- indukcję regulatorowych komórek Tr 1,
- przesunięcie odpowiedzi komórek Th1 w kierunku Th2,

- usunięcie allospecyficznym limfocytów T (negatywna selekcja w grasicy lub efekt cytotoksyczny).

Naukowa koncepcja tolerancji immunologicznej została opracowana przez Burnetta i Billingham'a przed 60 laty. Ówczesna teoria zakładała, że człowiek „uczy się” odróżniać własne tkanki w życiu płodowym, dzięki czemu możliwa jest identyfikacja zewnętrznych czynników infekcyjnych w okresie po urodzeniu [Pączek et al. 2003].

Obecnie zjawisko tolerancji dzieli się na mechanizmy centralne i obwodowe. Do grupy pierwszej zaliczamy eliminację limfocytów T i B o wysokim powinowactwie do własnych antygenów. Usuwanie autoreaktywnych komórek T odbywa się w grasicy w drodze delecji klonalnej, podczas selekcji negatywnej [Kisielow et al. 1988, von Boehmer et Kisielow, 2006]. Ponad 95% limfocytów T ulega apoptozie, zależnej od genu regulującego autoimmunizację (*AIRE*), poprzez stymulację ekspresji własnych tkankowo-specyficznym antygenów. Dodatkowo wpływ na przeżycie bądź śmierć tymocytów ma awidność receptorów TCR do własnych białek. Zbyt silna wywołuje apoptozę lub ponowną rearanżację genów kodujących TCR. Limfocyt T, którego receptor TCR ma niskie powinowactwo do własnych antygenów oraz uzyskuje dodatnią regulację genu *Bcl-2* unika śmierci. Proces ten nazywamy pozytywną selekcją klonów. Na mechanizmy centralne wpływ mają także komórki dendrytyczne pochodzące z krwi obwodowej, a które przenoszą własne antygeny do grasicy, aby zaprezentować je tymocytom. Dojrzałe, prawidłowo zrearanżowane limfocyty opuszczają grasicę i wychodzą na obwód. Od tego momentu podlegają procesom obwodowej tolerancji immunologicznej [Gupta et al. 2013, Hadeiba et al. 2012].

Obwodowe mechanizmy tolerancji dotyczące populacji komórek T odpowiadają za rozpoznanie, wyłapanie i usunięcie tych autoreaktywnym limfocytów, które uniknęły eliminacji w centralnych narządach limfatycznych [Sakaguchi et al. 2004]. Dziewicze limfocyty T na obwodzie wymagają do aktywacji dwóch sygnałów: prezentacji antygenów limfocytom T ($CD4^+$ zachodzi z udziałem MHC klasy II oraz $CD8^+$ z udziałem MHC I) przy udziale komórek APC oraz oddziaływaniu ligandu na komórce prezentującej z cząsteczkami kostymulatorowymi rodziny B7-CD28. Brak sygnału kostymulującego powoduje wejście limfocytów w stan anergii. Komórki w odpowiedzi na antygen nie wytwarzają IL-2 i nie proliferują. Do mechanizmów tolerancji obwodowej zaliczana jest również heterogenna grupa komórek o funkcji

regulatorowej tzw. limfocyty T reg, które wpływają na utrzymanie stanu tolerancji na własne antygeny. Są to naturalne T reg powstające w grasicy. Na obwodzie także mamy do czynienia z populacją limfocytów o potencjale regulatorowym, które powstają z dziewiczych komórek T CD4⁺CD25⁻, jako tzw. indukowane T reg [Josefowicz et al. 2012].

Podczas rozwoju guza w wyniku transformacji nowotworowej (INICJACJA - zajęcie mutacji w obrębie genów krytycznych odpowiadających za kontrolę cyklu życiowego, np. genów regulatorowych, supresorowych czy protoonkogenów) następuje namnażanie się z pojedynczej komórki szeregu nowych komórek, o zmienionych właściwościach. Charakteryzują się niskim stopniem zróżnicowania i mogą szybko rozprzestrzeniać się w organizmie, tworząc przerzuty. Dalsze etapy (PROMOCJA) prowadzą do aktywacji onkogenów i zwiększenia produkcji czynników odpowiedzialnych za wzrost i niekontrolowaną proliferację zmutowanych komórek. W tym czasie w wyniku presji układu immunologicznego dochodzi do selekcji części klonów, które tracą wrażliwość na cytotoksyczne mechanizmy efektorowe.

Oporność na egzogenne inhibitory wzrostu, apoptozę, nieograniczony potencjał replikacyjny, zdolność wytwarzania własnych sygnałów wzrostowych, wytwarzanie cytokin przeciwzapalnych, oddziaływanie z komórkami regulatorowymi czy ucieczka spod nadzoru immunologicznego pozwalają komórkom nowotworowym wykorzystać mechanizmy tolerancji immunologicznej do własnych celów i uzyskać swoistą autonomię. Szczególnym mechanizmem ułatwiającym rozwój nowotworu w organizmie jest immunomodulacja. Podczas tego zjawiska następuje przejściowe obniżanie się antygenowości komórek nowotworowych, polegające na tworzeniu na powierzchni błony komórkowej kompleksów antygen – przeciwciała. Kompleksy te przesuwają się w płaszczyźnie błony, na jeden z biegunów komórki, przejściowo eliminując antygeny nowotworowe z jej powierzchni [Pardoll et al. 2003].

Brak skutecznej odpowiedzi ze strony układu odpornościowego może być również spowodowany obecnością wolnych antygenów nowotworowych lub fragmentów błon komórek nowotworu. Badania potwierdzają, że im intensywniejsze uwalnianie TAA (efekt supresyjny) przez guza tym silniejsza korelacja z jego uzłośliwieniem [Finn et al. 2008]. Układ odpornościowy stykając się ze stopniowo wzrastającymi stężeniami TAA

jest poddany swoistej, nowotworowej immunoterapii wywołującej efekt immunotolerancji na dany antygen.

Odpowiedź komórkowa organizmu podczas choroby jest często nieefektywna a jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest brak cząsteczek kostymulujących na powierzchni komórek nowotworowych. Eksperymenty przeprowadzone na modelu mysim dowiodły, że transfekcja komórek guza genami kodującymi cząsteczki kostymulujące B.7, skutkowałą regresją nowotworu oraz indukcją odporności na ponowną ekspozycję na komórki. W celu zwiększenia immunogenności komórek nowotworowych indukowano ekspresję cząsteczek B.7 z wzmocnieniem aktywności kostymulującej samych komórek nowotworowych oraz wywoływano wzmocnienie funkcji komórek prezentujących antygen APC poprzez transfekcję genem czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów GM-CSF, który sprzyja wzrostowi, różnicowaniu i aktywacji komórek APC. Dokonywano również prób zwiększenia efektywności prezentacji antygenów nowotworowych przez komórki w wyniku nasilenia ekspresji cząsteczek MHC klasy II na ich powierzchni [Kosmaczewska et al. 2004].

XX wiek stał się okresem wzmożonego zainteresowania świata medycyny tematem immunologii nowotworów. Jak się okazało wytworzenie swoistej przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej jest trudne dla większości chorób nowotworowych, wśród których obserwujemy: słabą immunogenność, szybki wzrost guza, odporność komórek nowotworowych na lizę oraz zmienność.

1.5. Tworzenie i zróżnicowanie repertuaru receptorów antygenowych (TCR) limfocytów T

W obrębie układu odpornościowego mamy do czynienia z limfocytami T rozpoznającymi obce antygeny powstałe w wyniku komórkowej endocytozy pochodzenia wirusowego, bakteryjnego, pasożytniczego. Jest to możliwe dzięki znajdującym się na ich powierzchni receptorom limfocytów T (TCR) odpowiadającym za swoiste wiązanie fragmentów peptydowych połączonych z cząsteczkami MHC w błonie komórki prezentującej. Swoistość tychże komórek umożliwia rozpoznanie obcych antygenów i uruchamia odpowiedź ze strony układu odpornościowego. Każdy

limfocyt T posiada na swojej powierzchni jeden rodzaj receptora TCR o określonej swoistości antygenowej. Całkowita liczba różnych receptorów komórek T w organizmie określana jest jako repertuar TCR. Uważa się, że repertuar TCR w danym momencie w organizmie człowieka jest większy niż ilość krążących limfocytów [Davis et al. 1990]. Szacuje się, że jego różnorodność u ludzi wynosi ok. 10^{15} . Z kolei u myszy wartości te sięgają rzędu 10^9 różnych receptorów, a liczba komórek swoistych do danego kompleksu MHC-peptyd u myszy wynosi 0.8-10 komórek na milion limfocytów [Jenkins et al. 2012].

Receptor TCR zidentyfikowano po raz pierwszy metodą monoklonalnych przeciwciał, które wiązały się do pojedynczych klonów limfocytów T. Wywoływały one albo zahamowanie rozpoznawania antygeny przez te komórki albo ich aktywację, poprzez naśladowanie antygeny. Według tych eksperymentów ustalono, że każda komórka limfocyty T posiada na swojej powierzchni ok. 50 000 identycznych receptorów TCR. Pod względem czynnościowym receptory TCR różnią się od immunoglobulin, które wiążą dowolne antygeny. Mechanizm restrikcji MHC ten wyjaśnili Zinkernagel i Doherty, za co otrzymali w 1996 roku Nagrodę Nobla [Gołąb et al. 2005].

Ogromną różnorodność repertuaru TCR zapewnia szczególna konstrukcja genów kodujących receptor limfocytów T. Większość receptorów limfocytów T zbudowana jest z dwóch różnych polipeptydowych łańcuchów nazywanych $TCR\alpha$ (T-cell receptor α) oraz $TCR\beta$ (T-cell receptor β), połączonych wiązaniem disulfidowym. Każdy łańcuch jest połączony z komórką limfocyty T za pomocą krótkiego odcinka śródbłonkowego i wewnątrzkomórkowego ogona. Mniejszą grupę stanowią komórki T posiadające inne, ale strukturalnie podobne receptory TCR zbudowane z polipeptydowych łańcuchów γ i δ . We krwi obwodowej człowieka limfocyty T w 90% posiadają łańcuchy $\alpha\beta$ zaś 1-10% stanowią łańcuchy $\gamma\delta$. [Thomas et al. 2009; Gołąb et al. 2014].

Receptory $TCR\alpha\beta$ oraz $TCR\gamma\delta$ są połączone w błonie limfocytów T z cząsteczką CD3. Kompleks CD3 bierze udział w przykazywaniu sygnału aktywującego komórkę z receptora TCR, który umożliwia związanie antygeny do wnętrza komórki. Tak powstały kompleks TCR-CD3 komunikuje się w błonie komórkowej z innymi cząsteczkami obecnymi na powierzchni limfocyty T tj. CD2, CD5, CD4 lub CD8 [Reinherz et al. 1999, Mazza et al. 2007]. Geny odpowiadające za kodowanie receptorów TCR u człowieka znajdują się na chromosomie 7 ($TCR\beta$) i 14 ($TCR\alpha$).

Z kolei u myszy locus genu dla łańcucha α położony jest w chromosomie 14 i składa się z 98 segmentów $V\alpha$, 60 segmentów $J\alpha$ oraz 1 segmentu $C\alpha$. Locus dla genu łańcucha β TCR znajduje się w chromosomie 6 i zbudowany jest z 35 segmentów $V\beta$, 2 segmentów $D\beta$, 14 segmentów $J\beta$ oraz 2 segmentów $C\beta$. Na 5'- i 3'- końcu każdego z segmentów znajdują się RSS (sekwencje sygnałowe) dla rekombinacji. RSS są rozpoznawane przez białka RAG1 i RAG2, które są niezbędne do rekombinacji segmentów genu TCR [Oettinger et al. 1990]. RSS są heptamerami lub nanomerami oddzielonymi 12- lub 23- nukleotydową wstawką. W trakcie tworzenia się złącza sygnałowego, następuje wycięcie kolistej cząstki DNA i precyzyjne połączenie obu segmentów. Podczas łączenia się segmentu $V\alpha$ z $J\alpha$ w przypadku łańcucha α oraz $V\beta$, $D\beta$ i $J\beta$ w przypadku łańcucha β , następuje przyłączenie lub delecja nukleotydów, które nie są kodowane przez żaden gen. Dołączone przez transferazę nukleotydów terminalnych – TdT przypadkowe nukleotydy, określane są nukleotydami N. Obserwuje się również dodawanie nukleotydów komplementarnych do ostatnich nukleotydów złącza kodującego, które są nazywane nukleotydami P [Oettinger et al. 1990]. Rekombinacja zachodzi tylko i wyłącznie między fragmentami, w których jedna wstawka jest 12- nukleotydowa, a druga 23-nukleotydowa. Dzięki tej regule segment $V\alpha$ może połączyć się tylko z $J\alpha$, natomiast nie dojdzie do bezpośredniego połączenia genów $V\alpha$ i $C\alpha$. Proces rearanżacji łańcuchów $TCR\alpha$ i $TCR\beta$ rozpoczyna się od somatycznej rekombinacji zachodzącej podczas rozwoju limfocytów T. Funkcjonalne łańcuchy są otrzymywane w trakcie procesu transkrypcji, splicingu oraz translacji, w wyniku czego powstaje białko receptora TCR. Rekombinacja genów dla receptorów TCR limfocytów jest najczęściej spowodowana procesami wypętlenia i delecji. W znacznie mniejszym stopniu obserwuje się zjawisko inwersji czy wymiany chromatyd siostrzanych [Murphy et al. 2008].

Każdy łańcuch $TCR\alpha$ i $TCR\beta$ składa się z części stałych i zmiennych. Część zmienna łańcuchów TCR obejmuje 3 regiony hiperzmienne CDR, determinujące dopasowanie z antygenem. W segmencie V łańcucha α i β zlokalizowane są regiony CDR1 i CDR2, natomiast region CDR3 powstaje w trakcie rekombinacji i łączenia się ze sobą segmentów $V\alpha$ i $J\alpha$ łańcucha α oraz segmentów $V\beta$, $D\beta$ i $J\beta$ w przypadku łańcucha β . Podczas rekombinacji w tym fragmencie następuje dodawanie lub/i delecja nukleotydów, czyniąc ten fragment TCR najbardziej różnorodnym,

zaś różnorodność regionów CDR1 i CDR2 ogranicza się do tej już zawartej w genomie. Możemy założyć, że zróżnicowanie repertuaru receptora limfocytów T jest możliwe dzięki występowaniu kombinacji 3 mechanizmów:

- w czasie pierwszego następuje tworzenie różnych par łańcuchów i TCR,
- podczas drugiego następuje łączenie się różnych segmentów V, (D), J i C,
- przypadkowe dodawanie lub delecja nukleotydów na złączeniu segmentów V (D) i J [Murphy et al. 2008]

Najważniejszą rolę pełni region CDR3 łańcuchów α i β charakteryzujący się największą zmiennością. Pojedynczy limfocyt T posiada liczne kopie tego samego receptora TCR z unikalnym miejscem wiązania antygeny determinującym, które antygeny limfocyt T może związać. Rozpoznanie antygeny przez komórki T zachodzi tylko w kompleksie receptora TCR $\alpha\beta$ z cząsteczką MHC. W czasie tworzenia kompleksu TCR/MHC-p (klasy I i II) regiony CDR1 i CDR2 wiążą się przede wszystkim do cząsteczki MHC, zaś najbardziej zmienny region CDR3 wiąże się z peptydem związanym z cząsteczką MHC. Jest więc odpowiedzialny za antygenową swoistość komórki T i używany jest do identyfikacji pojedynczych klonów limfocytów T [Mazza et al. 2007, Marrak et al. 2008].

Pełna pula limfocytów T każdego organizmu obejmuje klasy limfocytów T z receptorem TCR $\alpha\beta$ oraz limfocyty z receptorem TCR $\gamma\delta$. Moment, w którym następuje uruchomienie ekspresji TCR $\alpha\beta$ czy TCR $\gamma\delta$ następuje na etapie DN (podwójnie negatywnych komórek). Komórki T, które właściwie zrearanzują locus TCR β ulegają kolejnej ekspresji łańcucha preTCR α na swojej powierzchni. Konsekwencją uzyskania kompleksu preTCR $\alpha\beta$ jest intensywna proliferacja komórek oraz ekspresja receptora CD4⁺ i CD8⁺ w stadium komórek DP (podwójnie pozytywnych). Tym samym ekspresja TCR $\gamma\delta$ zostaje wyciszona. Ma to związek z umiejscowieniem genów kodujących łańcuch δ między segmentami V α i J α , w obrębie locus TCR α . Prawidłowa rearanzacja w obrębie locus TCR α powoduje automatycznie utratę genów dla łańcucha δ (wycięcie locus). Receptory TCR $\gamma\delta$ różnią się od wcześniej opisanych receptorów mniejszą liczbą segmentów V i J, będących składowymi locusu γ i δ . Rekombinacja i ekspresja genów dla łańcuchów $\gamma\delta$ zachodzi wcześniej niż genów $\alpha\beta$ powodując ominięcie etapu komórek DP. W momencie przenikania do obwodowych narządów limfatycznych takie Limfocyty T

określane są jako CD4⁻CD8⁻ lub jako CD4⁺CD8⁻ i CD4⁻CD8⁺. Obecnie dostępne badania sugerują, że siłą odpowiadającą za uruchomienie ekspresji TCR αβ czy TCR γδ jest moc sygnału przechodzącego przez receptor TCR skorelowana z sygnałami od Notch1. Mocniejszy sygnał promuje komórki TCRγδ, natomiast słabszy sygnał limfocyty TCR αβ [Haks et al. 2005, Hayes et al. 2005]. W tej pracy wszelkie odniesienia do receptora TCR dotyczą receptora TCR αβ, w innym wypadku receptor określany jest jako TCR γδ. Rearanżacja genów *TCR* i synteza receptorów odbywa się niemalże wyłącznie w grasicy. Odstępstwem od tej reguły jest rekombinacja genów dla TCRγ odbywając się już w prekursorach tymocytów w wątrobie płodowej.

1.6. Sekwencjonowanie następnej generacji a badanie repertuaru TCR

Sekwencjonowanie jest to odczytywanie sekwencji, czyli kolejności par nukleotydowych w cząsteczce DNA. Historia tej techniki ma swój początek w osobie Freda Sangera, naukowca, który w roku 1977 opracował metodę sekwencjonowania DNA poprzez syntezę katalizowaną enzymatycznie. W metodzie Sangera sekwencjonowane są jednocześnie tylko 16-96 różnych matryc. Każda matryca jest mieszaniną wielu cząsteczek, które nie powinny, ale mogą się różnić. Za swoje osiągnięcia Fred Sanger i Walter Gilbert otrzymują nagrodę Nobla w 1980 r. Metoda Sangera położyła podwaliny pod opracowanie nowej, wydajniejszej techniki określanej wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem następnej generacji tzw. (deep sequencing).

Metody NGS opierają się o równoległe, masowe sekwencjonowanie od kilku tysięcy do kilkuset milionów różnych matryc – tzw. bibliotek. Sekwencjonowany materiał jest w pierwszej kolejności losowo fragmentowany, ligowany z uniwersalnymi adaptorami (tagami), rozcieńczany do odpowiedniego stężenia. Każda z finalnych matryc powstaje po amplifikacji klonalnej od pojedynczej cząsteczki poprzez PCR na matrycy 1 cząsteczki, jest zawsze homogenna. Każdy wariant allelu ma swoją homogenną reprezentację. Metody sekwencjonowania wykorzystują system SBS (sequencing by synthesis).

Przykłady zastosowania metody w badaniu repertuaru TCR obejmują:

- śledzenie tych samych klonów komórkowych, gdyż mają takie same TCR w różnych organach,
- sprawdzanie czy dany klon ulega ekspansji pod wpływem określonego antygeny czy nie,
- możemy porównywać różnorodność repertuarów,
- możemy sprawdzić czy klony komórek efektorowych Foxp3⁻ uległy konwersji do komórek regulatorowych (Foxp3⁺),
- sekwencjonowanie de Novo,
- resekwencjonowanie,
- analizy ekspresyjne RNA-seq,
- metagenomika,
- ChIP-seq, RIP-seq, CLiP-seq,
- szybkie i masowe sekwencjonowanie

Niniejsza praca doktorska opiera się o metodę Ion Torrent, zbliżoną do pirosekwencjonowania 454. Płytkę z włókna optycznego została zastąpiona chipem wytwarzanym identycznie jak komputerowe układy scalone. Chip (czujnik) zawiera miliony dołków, które zalane są próbką zawierającą DNA. Umieszcza się go w Ion PGM (Personal Genome Machine). Detekcja sygnału jest elektroniczna, nie wymaga obrazowania. Rozwiązanie to oferuje największe możliwości przy względnie niskich kosztach. Przykładowo zsekwencjonowanie tą metodą genomu *E. coli* jest możliwe już w 3 h. Szczegółowe omówienie tej metody znajduje się w rozdziale **3. MATERIAŁY I METODY**, podrozdziale **3.11. SEKWENCJONOWANIE NA PLATFORMIE ION TORRENT**.

1.7. Immunoterapie nowotworów - strategie i cele molekularne

Przedmiotem badań wielu immunologów oraz onkologów było od dawna uzyskanie korzyści terapeutycznych w leczeniu chorób nowotworowych. Próbowano dokonać tego poprzez aktywację układu immunologicznego. Lata 50 XX wieku rozpoczęły okres intensywnych badań nad modelami przeszczepialnych nowotworów w celu osiągnięcia odrzucenia guza z tkanki allogeniczej. Do eksperymentów wykorzystano zamiast

dzikiego typu szczurów, myszy wsobnych. Pierwsze eksperymenty wykazały, że chemicznie indukowane nowotwory są odrzucane przez syngeniczne myszy jak również zauważono, że występują silnie immunogenne antygeny unikalne dla każdego nowotworu. Noszą one nazwę TAS (nowotworowo-specyficznych antygenów). Z kolei słabo immunogenne antygeny nowotworowe są współdzielone przez różne nowotwory [Klein et al. 2001].

Ekspresja antygenów charakterystycznych dla komórek nowotworowych może indukować powstanie odpowiedzi odpornościowej. Z drugiej strony wykształcenie się guzów nowotworowych może prowadzić do indukcji tolerancji ze względu na obecność regulatorowych limfocytów T, mieloidalnych komórek supresorowych, cytokin supresorowych oraz cząsteczek kostymulatorowych o aktywności supresyjnej. Celem immunoterapii nowotworów jest przełamanie tolerancji immunologicznej oraz wykształcenie efektywnej odpowiedzi odpornościowej. Na szeroką skalę testuje się stosowanie przeciwciał monoklonalnych indukujących m.in. mechanizmy cytotoksyczności zależnej od przeciwciał oraz przeciwciała blokujące (cząsteczki kostymulatorowe o aktywności supresyjnej) tzw. punkty kontrolne układu odpornościowego (immune checkpoints). Z kolei w fazie testów dostępne są szczepionki, których działanie oparte jest na komórkach dendrytycznych. [Swatler et al. 2016] (Tabela 1).

Tabela 1. Przykłady punktów kontrolnych oraz przeciwciał je blokujących stosowanych w immunoterapii nowotworów (Swatler et al. 2016, tabela zmodyfikowana).

Punkt kontrolny	Przeciwciało	Rodzaj przeciwciała	Nowotwór
CTLA-4	Ipilimumab	ludzkie	czerniak
	Tremelimumab	ludzkie	drobnokomórkowy płuc
PD-1	Nivolumab	ludzkie	czerniak
	Pembrolizumab	humanizowane	czerniak
PD-L1	BMS-936559	ludzkie	-
	MPDL3280A	humanizowane	-
LAG-3	BMS-986916	ludzkie	-

Z kolei inne eksperymenty dowodzą, że tzw. nokauty genowe genów odpowiedzialnych za kodowanie elementów odpowiedzi immunologicznej wpływają na proces nowotworzenia u zwierząt doświadczalnych (Sakaguchi et al. 2004). Dane te wskazują na wpływ układu odpornościowego gospodarza na powstanie i wzrost nowotworów oraz rodzaj zastosowania leczenia, w tym immunoterapii. W przypadku immunoterapii ważne jest obranie właściwego kierunku badań a w szczególności zrozumienie skomplikowanych relacji między komórkami nowotworowymi a komórkami układu odpornościowego. Wiedza ta dotyczy dwóch antagonistycznych względem siebie procesów tj. usuwanie komórek nowotworowych przez komórki układu immunologicznego oraz powstania immunosupresji, która pozwala komórkom nowotworu na ucieczkę kontroli immunologicznej gospodarza [Dunn et al. 2004, Kim et al. 2007].

Coraz lepsze zrozumienie wpływu tolerancji, odporności i immunosupresji na mechanizmy regulacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej umożliwiło opracowanie skutecznych terapii celowanych, które pozwolą uzyskać silną i długotrwałą odpowiedź u pacjentów. W obrębie badań nad immunoterapią skierowaną przeciwko nowotworom możemy wyróżnić terapie bierne: stosowanie przeciwciał monoklonalnych, transfer adoptywny limfocytów T oparty na specyficzności antygenowej oraz czynne: szczepionki przeciwnowotworowe i inhibitory punktów kontrolnych cyklu komórkowego, które aktywują odpowiedź immunologiczną niespecyficzną. [Galluzzi et al. 2014].

Obecnie standardowe leczenie nowotworów opiera się na trzech tradycyjnych metodach: radioterapia, chemioterapia i chirurgia. Dzięki rozwojowi immunoterapii, możliwości wykorzystania własnego układu odpornościowego do walki z nowotworami złośliwymi, stało się potężną bronią w arsenale współczesnej medycyny. W niniejszej pracy omówione zostaną szerzej przykłady cząsteczek, które obecnie dają największą szansę na wyleczenie chorób nowotworowych, z pominięciem inwazyjnych, klasycznych terapii.

1.7.1. Immunoterapia nowotworów a komórki T regulatorowe

Wiele eksperymentów na poziomie laboratoryjnym, dzięki dobrym rokowaniom rozpoczęło fazę badań klinicznych, dając nadzieję na znalezienie skutecznych terapii celowanych. Takim przykładem są komórki regulatorowe. Zakres badań T reg jest szeroki i obejmuje m.in.:

- deplecję komórek T reg: podanie niskiej dawki cyklofosfamid powoduje redukcję liczby komórek CD4⁺CD25⁺, obniżenie funkcji regulatorowych oraz wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej wobec nowotworu,
- regulację funkcji komórek T reg: sygnałowanie przez cząsteczki występujące na powierzchni komórek T reg, należące do nadrodziny TNFR tj. OX40, 4-1BB, GITR, może obniżać ich funkcje regulatorowe,
- hamowanie indukcji komórek iT reg: obniżenie poziomu prostaglandyn E2 wydzielanych przez nowotwory, które podnoszą ekspresję Foxp3 i CD25 na komórkach CD4⁺,
- zapobieganie konwersji komórek iT reg: zablokowanie produkcji, funkcji wydzielanych cytokin np. blokowanie TGF – β [Petrausch et al. 2009].

Dotychczasowe badania na zwierzętach wskazują, że eliminacja komórek CD25⁺ wzmacnia odpowiedź immunologiczną indukowaną przez komórki nowotworowe lub pobudzone antygenem komórki dendrytyczne. Zmniejszenie liczby tych komórek w środowisku guza powoduje zahamowanie rozwoju nowotworu [Prasad et al. 2005, Golgher et al. 2002]. Jednorazowe usunięcie komórek CD25⁺ z guza, zatrzymuje jego wzrost, wielokrotne powtarzanie tej procedury, opóźnia jego progresję. Z kolei deplecja za pomocą swoistych przeciwciał cząsteczki CD4 z guza również wskazuje na efekt terapeutyczny, czyli zahamowanie rozwoju choroby. [Needham et al. 2006, Yu et al. 2005]. Ważnym problemem pojawiającym się podczas tych zabiegów jest nieprecyzyjność metody i usuwanie wszystkich komórek zawierających cząsteczkę CD25⁺, zarówno T regulatorowych jak i T efektorowych.

Opracowano metodę usuwania komórek z ekspresją receptora CD25 o wysokim powinowactwie za pomocą preparatu zawierającego rekombinowane białko (część łańcucha IL-2 z fragmentami A i B toksyny błonicy) Denileukin diftitox (Ontak®). Został wprowadzony do leczenia chorych ze skórą postacią chłoniaka z komórek T. Podanie

pojedynczej dawki denileukin diftotox selektywnie eliminuje Treg co w dalszym etapie po podaniu szczepionki z komórkami dendrytycznymi u chorych z rakiem nerki, poprawia odpowiedź [Dannull et al. 2005]. Inne możliwości unieszkodliwienia komórek regulatorowych to terapie celowane skierowane przeciwko cząsteczkom powierzchniowym znajdującym się na Treg (GITR, B7-H1) lub przeciwko cytokinom/chemokinom, które mają wpływ na przeżycie, ekspansję oraz migrację Treg (TGF- β , IL-2, CCL22). Poszerzenie wiedzy w tym zakresie pozwoli na precyzyjniejsze wdrożenie immunoterapii w leczenie nowotworów za pomocą limfocytów T reg.

1.7.2. GITR

GITR pierwotnie został odkryty przez Nocentini i współpracowników jako gen ekspresjonowany w mysiej hybrydomie T komórkowej traktowanej deksametazonem [Nocentini et al. 1997]. Zidentyfikowano również homolog GITR na ludzkich komórkach T, wykazujący 55% identyczności z mysim GITR (AITR) [Gurney et al. 1999]. GITR (Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor) jest to białko receptorowe, należące do grupy czynników martwicy nowotworowej (TNFR). Jest transmembranowym białkiem typu I (228 aa/ 35-40 kDa) ulegającym ekspresji przede wszystkim na limfocytach T, jak również innych komórkach (Tabela 2).

Tabela 2. Poziom ekspresji białka GITR na powierzchni komórek (Nocentini et al. 2009).

Typ komórki	Poziom ekspresji GITRu
Naiwne CD4+CD25- (limf. T efektorowe)	Średni
Naiwne CD8+ (limf. T efektorowe)	Średni/ niski
CD4+CD25+ Foxp3+ (limf. T reg)	Wysoki
Komórki NK	Średni
Limfocyty B	Niski
Monocyty/ Makrofagi	Niski
Plazmatyczne komórki dendrytyczne (DCs)	Brak ekspresji
Dojrzałe komórki dendrytyczne	Brak ekspresji
Komórki tuczne	Średni
Leukocyty wielojądrzaste (PMNs)	Średni

Eozynofile	Średni/ niski
Bazofile	Średni/ niski
Aktywowane limf. T z funkcjami efektorowymi	Wysoki/bardzo wysoki
Aktywowane limf. T z funkcjami regulatorowymi	Bardzo wysoki
Aktywowane komórki NK	Wysoki
Aktywowane limf. B	Średni/ niski
Aktywowane monocyty/ makrofagi	Średni/ niski
Aktywowane plazmatyczne komórki dendrytyczne	Średni
Aktywowane komórki dendrytyczne	Średni
Aktywowane komórki tuczne	Średni
Aktywowane komórki wielojądrzaste	Wysoki
Komórki endotelialne (ECs)	Brak ekspresji
Aktywowane komórki endotelialne	Średni/ niski
Keratynocyty	Średni
Osteoklasty	Niski

Obecnie zidentyfikowano trzy izoformy cząsteczki GITR, w tym jedna ma postać rozpuszczalną, której brak domeny transbłonowej [Shimizu et al. 2002]. Homologia domeny cytoplazmatycznej pomiędzy GITR, 4-1BB, CD27 oraz OX40 pozwala na wyodrębnienie nowej podrodziny kostymulatorów, w obrębie nadrodziny TNFRSF [McHugh RS et al. 2002]. GITR i inne cząsteczki wiążą TRAF i aktywują NF-κB (poprzez signaling TRAF2–NIK) oraz ligand GITR (GITRL). GITRL należy do nadrodziny TNF (TNFSF) i jest naturalnym ligandem GITR. Komórki regulatorowe CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ naturalnie posiadają konstytutywnie wyższe poziomy GITR niż konwencjonalne limfocyty T CD4⁺ i CD8⁺ [Shimizu J et al. 2002]. Wykazano, że receptor GITR wykazuje ścisłą korelację z ekspresją Foxp3 (czynnika transkrypcyjnego będącego wewnątrzkomórkowym markerem limfocytów T reg tj. wszystkie komórki Foxp3⁺ są GITR⁺. Poziom ekspresji cząsteczki GITR na powierzchni komórek efektorowych jest niski, ale zarówno na T ef jak i T reg ulega podwyższeniu w wyniku aktywacji. Badania *in vitro* wskazały, że równoczesna kostymulacja cząsteczek GITR i receptora antygenowego TCR na limfocytach T reg powoduje zahamowanie ich zdolności do pełnienia funkcji supresorowej,

a na limfocytach efektorowych ułatwia ich aktywację, proliferację i wytwarzanie przez nie cytokin [Kanamaru et al. 2004, Stephens et al. 2004].

Stymulacja GITR moduluje komórki Treg, jednak sam GITR nie jest niezbędny dla ich funkcjonowania. U myszy z niedoborem GITR (GITR^{-/-}) nie obserwuje się spontanicznie powstających chorób autoimmunologicznych. Wykazują one upośledzone odpowiedzi limfocytów T *in vivo* [Ronchetti, et al. 2002; Stephens GL et al. 2004] ponieważ są bardziej podatne na śmierć komórkową indukowaną aktywacją (AICD). Sugeruje to, że GITR może chronić limfocyty T przed tym procesem. Jednak silny sygnał przez TCR przy jednoczesnej ligacji GITR może wzmocnić zjawisko AICD na efektorowych komórkach CD4⁺ [Kanamaru et al. 2004]. Eksperymenty z limfocytami T z myszy GITR^{-/-} wskazują też na hiperproliferyzację limfocytów związaną z stymulacją TCR, wzrost produkcji IL-2, wzrost poziomu ekspresji cząsteczki CD25 oraz zwiększoną podatność na AICD.

Po aktywacji, naiwne limfocyty T i T reg, podwyższają ekspresję GITR w 24-72 godz. po pojawieniu się początkowego bodźca. Ekspresja ta utrzymuje się przez kilka dni. Ten opóźniony wzór ekspresji na komórkach efektorowych przypomina 4-1BB i OX40 i sugeruje, że GITR nie odgrywa dominującej roli we wczesnych etapach stymulacji limfocytów T, ale raczej wywiera działanie w późniejszym czasie [Dawicki et al. 2004]. Stymulacja GITR przez monoklonalne agonistyczne przeciwciało DTA-1 zaburza obwodową tolerancję immunologiczną myszy [Shimizu et al. 2002] poprzez zahamowanie regulatorowej funkcji limfocytów T CD4⁺ i wzmacnia odpowiedź konwencjonalnych limfocytów T. Efekt sygnałowania GITR na konwencjonalnych limfocytach T powoduje, że są one bardziej odporne na supresję przez regulatorowe limfocyty T CD4⁺ [Ashrafal Haque et al. 2010].

Stymulacja GITR zwiększa również produkcję prozapalnych cytokin np. Interferonu γ (IFN- γ), czynnika martwicy nowotworów (TNF- α), IL-6 i IL-12. Wzmacnia odpowiedź humoralną, taką jak poziom surowicy IgG2b i IgA, który jest całkowicie zależny od limfocytów T CD4⁺. Obserwuje się wzmocnienie zarówno odpowiedzi typu 1 (Th 1), jak i odpowiedzi typu 2 (Th 2) [Lee Sun K. et al. 2006].

W świetle powyższych badań podjęto próby wykorzystania cząsteczki GITR w immunoterapii anti-nowotworowej. National Cancer Institute zaliczyło ten receptor w 2006 roku jako jeden z 12 najbardziej obiecujących celów immunoterapii.

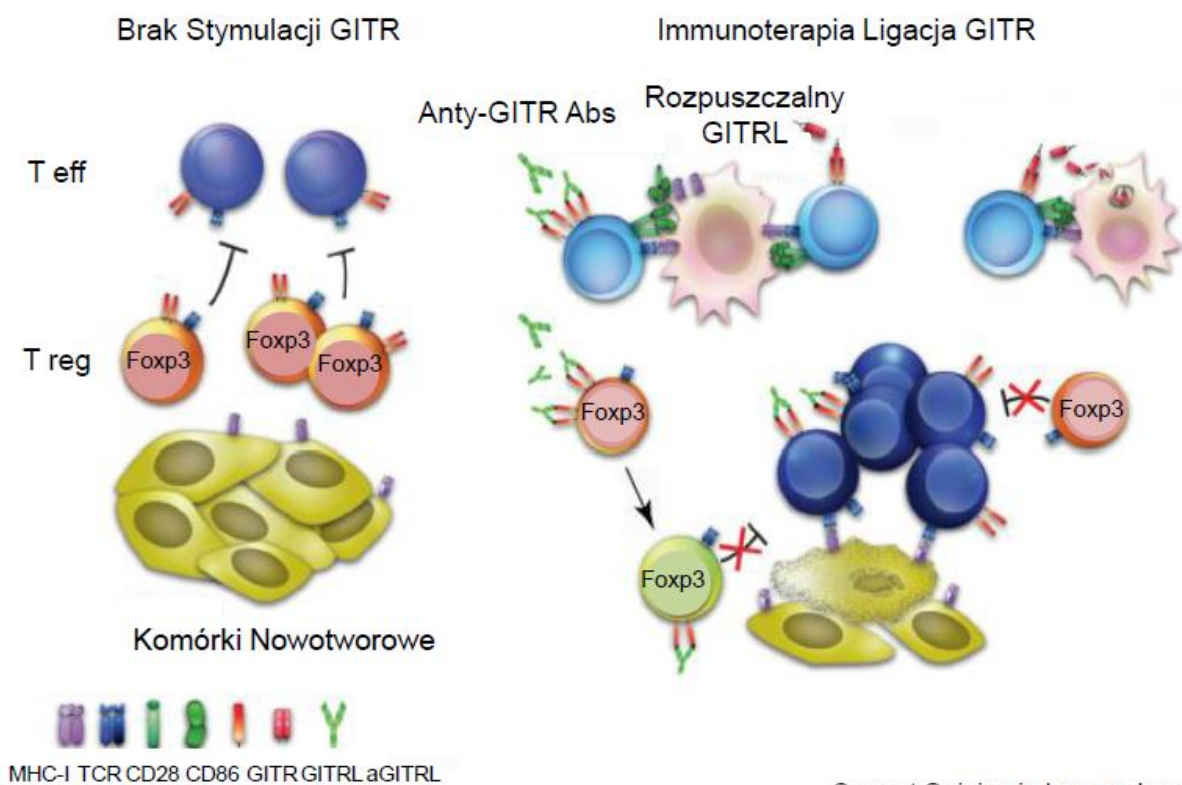
Zainteresowanie cząsteczką GITR rozpoczęło się na podstawie raportów wykazujących, że agonistyczne przeciwciała anti-GITR (szczurze monoklonalne DTA-1 i kozie poliklonalne) mogą przełamywać tolerancję immunologiczną i znosić hamowanie aktywacji limfocytów T ef przez T reg *in vitro* [Shimizu et al. 2002; Placke et al. 2010].

Leczenie agonistycznym przeciwciałem anti-GITR (klon DTA-1) indukuje odrzucenie wysoce immunogennych guzów, ale jest znacznie mniej skuteczne przeciw słabo immunogennym nowotworom. Mab anti-GITR indukuje odrzucenie pierwotnego guza B16. Cząsteczka GITR dostarcza sygnał stymulujący dla efektorowych limfocytów T, co prowadzi do zwiększenia przeżywalności, proliferacji, produkcji cytokin, i wytworzenia oporności na supresję komórkową przez limfocyty T reg. Stymulacja GITR zmniejsza również akumulację komórek T reg i stabilność ich fenotypu supresorowego w obrębie nowotworów B16 [Anik L. Coˆte et al. 2011].

Zgodnie ze zdolnością DTA-1 do zaburzania supresji T reg *in vitro*, myszy potraktowane mAb DTA-1 (podanie w dniu 4 i w dniu 8 po pierwotnym wszczepieniu nowotworu B16) odrzuciło lub zdecydowanie opóźniło rozwój nowotworu. Obecne badania dowodzą, że pojedyncza dawka DTA-1 może wyleczyć małe guzy B16, o ile została ona podana do 4 dni po przeszczepie komórek nowotworowych. Wpływ DTA-1 na odporność przeciwnowotworową jest stosunkowo długi i wynosi do 70 dni, przy 2 krotnym podaniu komórek guza w trakcie trwania eksperymentu (badania własne). Terapeutyczny efekt DTA-1 uzyskano również w wielu modelach nowotworów takich jak: guzy okrężnicy CT26, chłoniak A20. Inaktywacja, ekspansja i wyczerpanie limfocytów Treg to trzy możliwe wyniki ligacji cząsteczki GITR za pomocą mAb DTA-1 na komórkach Treg [Turk et al. 2004, Ko et al. 2005, Sharma S et al. 2008].

W początkowej fazie odpowiedzi immunologicznej naiwne komórki T są aktywowane przez interakcje między receptorem TCR a cząsteczkami MHC, ulegają kostymulacji poprzez wiązanie CD28 z CD80 lub CD86. Po przekroczeniu tego punktu kontrolnego, limfocyty T przechodzą wtórne rundy kolejnego aktywowania i ekspansji, następuje podwyższenie poziomu receptora GITR, 24-72 h po pierwszej aktywacji. Jeśli GITR-L jest ekspresjonowany przez komórki dendrytyczne, zmienia jakość i ilość odpowiedzi immunologicznej. Rezultatem netto jest nasilona reakcja

zapalna, ze zwiększoną aktywnością antygenowo–specyficznych komórek T. Badania przedkliniczne wskazują, że sygnalizacja poprzez GITR może zwiększać aktywację T_{eff} i modulować aktywność limfocytów regulatorowych wewnątrz guza, podczas immunoterapii (Ryc. 5.)



Current Opinion in Immunology

Ryc. 5. Model funkcjonowania cząsteczki GITR podczas odpowiedzi immunologicznej (Schaer et al. 2012).

Użycie agonistycznego przeciwciała anty-GITR lub ligandu GITRL, znosi supresyjne działanie komórek regulatorowych, wzmacnia autoreaktywne i alloreaktywne odpowiedzi limfocytów T oraz nasila autoimmunizację i choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) [Cohen et al. 2006]. Obecne badania sugerują, że rola GITR może polaryzować odpowiedź immunologiczną w kierunku Th1. Poza limfocytami T również komórki NK ekspresjonują wysoki poziom GITR. Badania nad cząsteczką GITR, OX40 i 4-1BB na komórkach NK wykazały, że ich stymulacja prowadzi do zwiększonej cytotoksyczności i produkcji IFN γ [Croft et al. 2010].

Konsensus co do roli GITR w komórkach NK nie został osiągnięty. Mitsui et al dowodzą o skuteczności leczenia skojarzonego opartego o przeciwciała mAb

anty-CTLA-4 / anty-GITR. Terapia łączona wykazuje mocniejsze działanie przeciwnowotworowe w porównaniu z samym mAb i powoduje odrzucenie guzów. Takie działanie jest spowodowane zwiększeniem liczby komórek T CD8⁺ naciekających nowotwór za pomocą leczenia anty-CTLA-4 i zwiększonego wydzielania cytokin i zwiększoną oporność komórek T CD8⁺ swoistych wobec nowotworu na supresję T reg CD4⁺CD25⁺ przez leczenie anty-GITR. Oporność specyficznych nowotworowo komórek T CD8⁺ względem hamowania przez T reg u myszy otrzymujących mAb anty-GITR wykrywano głównie w populacji limfocytów T CD8⁺, ze zwiększoną ekspresją cząsteczki CD25 [McHugh RS et al 2002; Shevach EM et al. 2006]. Komórki T CD8⁺ hodowane z mAbs anty-GITR lub anty-CTLA-4 / anty-GITR utrzymują zdolność proliferacyjną w obecności T reg. Z kolei proliferacja limfocytów T CD8⁺ w hodowli kontrolnej lub hodowlach z mAb anty-CTLA-4 zostaje całkowicie stłumiona przez T reg. Leczenie anty-CTLA-4 w połączeniu z anty-GITR (bezpośrednie / pośrednie blokowanie funkcji Treg) lub/i anty-CD25 (deplecja Treg) wzmacnia przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną także poprzez zwiększone wydzielanie IFN- γ . Leczenie mAb anty-GITR nie zmienia aktywności komórek regulatorowych, ale zmniejsza ich akumulację wewnątrz guza [Jun Mitsui et al. 2010].

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była ocena różnorodności repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T (TCR) w trakcie przebiegu eksperymentalnej immunoterapii mysiego czerniaka B16, za pomocą przeciwciała anty - GITR (DTA-1). Podjęto próbę zbadania zależności pomiędzy populacją komórek T efektorowych a populacją komórek supresorowych, w wyniku podania przeciwciała DTA-1 w celu określenia czy stymulacja przez receptor GITR prowadzi do ich selektywnej ekspansji, konwersji czy zaniku.

W eksperymentach wykorzystano transgeniczny model myszy o ograniczonym repertuarze TCR $\alpha\beta$ (TCR^{mini}Foxp3^{GFP}), w którym limfocyty T ekspresjonują naturalnie generowany, ale ograniczony repertuar TCR oraz myszy dzikiego typu C57BL/6(B6) Foxp3^{GFP}. Badania swoim zakresem objęły:

- monitorowanie zmian jakościowych i ilościowych w klonalnej dystrybucji komórek T efektorowych i T regulatorowych swoistych wobec antygenów nowotworowych z melanomy A^bEp63K GFP, podczas wzrostu guza u myszy kontrolnych oraz poddanych immunoterapii anty-GITR,
- analizę cytofluorymetryczną komórek pochodzących ze środowiska guza, węzłów drenujących oraz węzłów obwodowych (najbardziej oddalonych),
- sort wybranych subpopulacji komórkowych, izolacja RNA, otrzymanie cDNA, amplifikacja fragmentu CDR3 genu TCR α ,
- wytworzenie hybrydom limfocytów T,
- identyfikację reaktywnych TCR wobec neoantygeny A^bEp63K,
- analizę różnorodności klonów komórkowych T_H1 i T_{reg} z tymi samymi reaktywnymi receptorami TCR nowotworowymi.

Wykorzystano sekwencjonowanie nowej generacji (Ion Torrent) jako metodę pozwalającą na śledzenie/ zbadanie losu poszczególnych receptorów TCR na poziomie pojedynczych komórek T, rozpoznających czerniaka B16 u myszy nieleczonych i traktowanych przeciwciałem DTA-1.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał laboratoryjny

3.1.1. Media hodowlane

Tabela 3. Skład pożywki hodowlanej dla komórek hybrydoma produkujących przeciwciało DTA-1, limfocytów T wyizolowanych z narządów limfoidalnych myszy oraz grasiczaka BW NFAT GFP.

Nazwa	Objętość	Firma
αMEM (Minimum Essential Pożywka)	500 ml	Sigma-Aldrich
10% Cieleńca surowica płodowa (FBS - Fetal Bovine Serum)	50 ml	HyClone
200 mM L-glutamina	5 ml	Sigma
Aminokwasy (Non-essential aminoacid)	5 ml	Sigma
100 mM Pirogronian Sodu	5 ml	Sigma
100 mM Pen/Strep (Antybiotyki)	5 ml	Sigma
0,007% 2-Merkaptoetanol *	5 ml bazy	Sigma-Aldrich

* W przypadku 2-Merkaptoetanolu uprzednio przygotowano roztwór roboczy, w którym użyto 7 µl substancji na 10 ml αMEM. Tak wykonaną bazę użyto do złożenia pożywki hodowlanej.

Tabela 4. Skład pożywki hodowlanej dla czerniaka B16 A^bEp63K.

Nazwa	Objętość	Firma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Pożywka)	500 ml	Sigma-Aldrich
10% Cieleńca surowica płodowa (FBS - Fetal Bovine Serum)	50 ml	HyClone

200 mM L-glutamina	5 ml	Sigma
Aminokwasy (Non-essential aminoacid)	5 ml	Sigma
100 mM Pirogronian Sodu	5 ml	Sigma
100 mM Pen/Strep (Antybiotyki)	5 ml	Sigma
0,007% 2-Merkaptoetanol	5 ml	Sigma-Aldrich

Tabela 5. Media selekcyjne stosowane w trakcie wyprowadzania homogenych linii komórkowych hybrydoma swoistych wobec antygeny Ep63K.

Nazwa	Zastosowanie	Firma
HAT + α MEM (Minimum Essential Pożywka)	Hodowla hybrydom po wykonaniu fuzji	Sigma
HT + α MEM (Minimum Essential Pożywka)	Hodowla hybrydom po ~ 2 tyg. od wykonania fuzji	Sigma

Wszystkie pożywki wykorzystane w hodowlach komórkowych filtrowano przez filtr 0,22 μ m (Millipore) w celu zachowania sterylności pożywki.

3.1.2. Bufory

Tabela 6. Podstawowe bufory wykorzystywane przy izolacjach komórkowych, hodowli komórek, cytometrii przepływowej (FACS), testach funkcjonalnych.

Nazwa	Składniki
WB (Wash Buffer) bufor płuczący	PBS (bez jonów Mg^{2+} i Ca^{2+}), 2% FBS (inaktywowany)

ACK	NH ₄ CL – 8,3g KHCO ₃ - 1 g 5% EDTA – 1,8 ml MiliQ – do 1000 ml
Binding Buffer (test z Anexyną V)	10mM HEPES, pH 7.4, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl ₂

Tabela 7. Bufory i żele wykorzystywane w biologii molekularnej.

Nazwa	Składniki
TAE (50X)	TRIS -242g CH ₃ COOH -61.83g 0.5M EDTA, pH 8-100ml MiliQ do 1000ml
LB (Load Buffer) bufor obciążający do elektroforezy DNA	40% Sacharoza, 0,5% Błękit bromofenolowy H ₂ O miliQ
Żel agarozowy 1-2% do elektroforezy DNA	1-2% Agarozą, 50ml 1x bufor TAE, 2,5µl 1% r-ru Bromku etydyny

3.1.3. Przeciwciała

Tabela 8. Przeciwciała zastosowane w genotypowaniu myszy transgenicznych.

Nazwa	Firma	Koniugat	Rozcieńczenie
CD 4	BD Biosciences	APC	1:500
Vα 2	BD Biosciences	PE	1:500
Vβ14	BD Biosciences	FITC	1:400

Tabela 9. Przeciwciała zastosowane w analizie cytofluorymetrycznej.

Nazwa	Firma	Koniugat	Rozcieńczenie	Zastosowanie
CD 4	BD Biosciences	APC	1:500	FACS, sort
CD 8	BD Biosciences	PE	1:300	FACS, sort
CD 25	BD Biosciences	PeCy7	1:400	FACS
GITR	eBiosciences	biotynyl.	1:100	FACS
CD62L	eBiosciences	APC	1:400	FACS
Thy-1	BD Biosciences	PE	1:400	FACS, sort
Anexyna V	BD Pharmingen	APC	1:100	FACS
CD28	eBiosciences	-	-	Aktywacja limf. T
CD3	eBiosciences	-	-	Aktywacja limf. T

3.1.4. Startery molekularne

Wszystkie startery wykorzystane w reakcjach PCR zostały zsyntezowane przez Pracownię Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie.

Tabela 10. Startery zastosowane w genotypowaniu myszy transgeniczných.

Gen	Nazwa startera	Pozycja	Sekwencja
TCR V α 2	V α Ja	5'	TAACACTTGGCAAGAGTTACTCATTAG
	PTA J α NO7	3'	GACTTACCTGGCTTTATAATTAGCTTG
TCR V β 14	TB179	5'	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC
	Jb2.6.3	3'	TACTATCGATTTCCCTCCCGGAGATTCC
β aktyna	mAct_s	5'	TGTCATGGTAGGTATGGGTCAGAAGG
	mAct_rev	3'	GATGTGCGGCACAATCTCACGTTTCAG
GFP	e_GFP	5'	CCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCCG
	Foxp3	3'	CCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCC

Tabela 11. Startery wykorzystane do syntezy cDNA, amplifikacji fragmentów CDR3 TCR α .

Nazwa	Poz	Sekwencja
TCR CA3	3'	TCGGCACATTGATTTGGGAGTC
V α 2_88s	5'	CAGCAGGTGAGACAAAGTCCCC
ITAdBCA1	X	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTGGTACACAGCAGGTTCTGGGT
ITadA	3'	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
ITadB	5'	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT
TCR CA1	3'	TGGTACACAGCAGGTTCTGGGT
V α 2_235	5'	TCTCAGCCTGGAGACTCAGC

Tabela 12. Zestaw tagów użytych w tworzeniu bibliotek regionów CDR3.

Nazwa	Poz	Sekwencja znacznika	Pełna sekwencja
MID 1	5'	ACGAGTGCGT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGC GTTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 2	5'	ACGCTCGACA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCGACATCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 3	5'	AGACGCACTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACGCACTCTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 4	5'	AGCACTGTAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACTGTAGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 5	5'	ATCAGACAGG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCAGACAGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 6	5'	ATATCGCGAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATATCGCGAGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 7	5'	CGTGTCTCTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTGTCTCTATCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 8	5'	CTCGCGTGTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTCGCGTGTCTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 9	5'	TAGTATCAGC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGTATCAGCTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 10	5'	TCTCTATGCG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCTATGCGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 11	5'	TGATACGTCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGATACGTCTTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 12	5'	TACTGAGCTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACTGAGCTATCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 13	5'	CATAGTAGTG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCATAGTAGTGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 14	5'	CGAGAGATAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGAGATACTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 15	5'	ATACGACGTA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATACGACGTATCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 16	5'	TCACGTAATA	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGTAATACTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 17	5'	CGTCTAGTAC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTCTAGTACTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 18	5'	TCTACGTAGC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACTAGTACTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 19	5'	TGTAATACTC	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTACTACTCTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 20	5'	ACGACTACAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGACTACAGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 21	5'	CGTAGACTAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTAGACTAGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 22	5'	TACGAGTATG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGAGTATGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 23	5'	TACTCTCGTG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACTCTCGTGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 24	5'	TAGAGACGAG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGAGACGAGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC
MID 25	5'	TCGTCGCTCG	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGTCGCTCGTCTCAGCCTGGAGACTCAGC

Zastosowane startery użyto w celu wykonania głębokiego sekwencjonowania na platformie Ion Torrent.

3.1.5. Odczynniki i sprzęt wykorzystane w eksperymentach

Tabela 13. Zestaw odczynników użytych w doświadczeniach.

Odczynnik	Firma
Ampicylina	Sigma-Aldrich
Bromek etydyny	Sigma-Aldrich
Chlorek magnezu (MgCl ₂)	Stanlab Sp.J.
Chlorek Sodu (NaCl)	Stanlab Sp.J.
DMSO (Dimetylosulfotlenek)	LabEmpire
DNAza	Fermentas
dNTP (mieszanina deoksynukleotydów)	Fermentas
EDTA (kwas wersenowy)	Sigma-Aldrich
FBS (surowica bydlęca)	Cytogen (bufor FACS), HyClone (hodowle)
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Scientific
Glicyna	POCH
L-glutamina (200mM)	Thermo Scientific
Lymphodex	Inno-Train Diagnostik
Marker masy DNA – GeneRuler™ 1kb DNA	Fermentas
Non-essential amino acids – 100mM	Gibco
Odwrotna transkryptaza SuperScript III	Invitrogen
Penicylina / Streptomycyna (roztwór 100x)	Sigma-Aldrich
Pirogronian sodu	Sigma-Aldrich
Polimeraza DNA DreamTaq	Fermentas
Protein G (białko G bakterii <i>Streptococcus sp.</i>)	Sigma-Aldrich
Random primers (startery losowe)	Promega

RNeasy Mini kit	Qiagen
β-merkaptopoetanol	Sigma-Aldrich
Alkohol etylowy 96%	POCH
AccuPrime™ Taq DNA	ThermoFisher Scientific

Tabela 14. Sprzęt laboratoryjny i plastik używany podczas eksperymentu.

Sprzęt	Firma
Plastikowe końcówki do pipet: (10µl / 200µl / 1000µl / 5000µl)	Sarsted, Genoplast
Plastikowe końcówki do pipet z filtrem: (10µl / 200µl / 1000µl / 5000µl)	Sarsted, Genoplast
Plastikowe probówki: (0,5 ml / 1,5 ml / 2ml) typu eppendorf	Eppendorf, Sarstedt, Genoplast
Probówki typu Falcon: (15 ml / 50ml)	Sarsted, Genoplast
Pipety	Eppendorf / HTL Lab Solution
Termoblok grzejący z funkcją wytrzęsania	Eppendorf Thermomixer Compact
Wirówki	Sigma (1-14K)
	Eppendorf (Centrifuge 5417 R)
	Sigma (4 K15)
	Heraeus Instruments (Megafuge)
Zamrażarki: -20°C ; -80°C	Ardo, -80°C Ultralow Frezer, NUAIRE
Aparat do elektroforezy DNA (RNA)	Bächler, Feinstech
Aparat do analizy żeli w świetle UV	Vilber Lourmat
Laminar PCR	Skair VFC90
Probówki typu eppendorf (0,2ml)	Sarsted, Genoplast

Probówki w paskach (0,2ml)	Nippon Genetics
Spektrofotometr	Thermo Scientifics NanoDrop 2000
Spektrofotometr płytkowy	Perkin Elmer Wallac 1420 Victor 2
Termocykler	MJ Research PTC-200
Inkubator komórkowy	Water-Jacketed IR Autoflow Automatic CO2 Incubator model NU-8500, NUAIRE
Komora laminarna	Class IIA/B3 Biological Safety Cabinet Forma Scientific
Łaźnia wodna	Biosaun WB4
Płytki 6-dołkowa, 24-dołkowa, 96- dołkowa, Szalki Petriego	Greiner Bio-One
Probówki U-kształtne	BD Falcon
Cytometry przepływowe	Facs Calibur BD FACS CANTO II LSR Fortessa
Sorter komórkowy	BD Aria

3.1.6. Zwierzęta eksperymentalne

W ramach projektu prowadzono prace związane z hodowlą myszy transgenicznych wykorzystanych w eksperymentach. Hodowla obejmowała: krzyżowanie odpowiednich osobników ze sobą, genotypowanie oraz potwierdzenie występowania transgenów u myszy metodą cytometrii przepływowej.

Wykorzystano następujące szczepy:

- **myszy TCR^{mini}FOXP3^{GFP}**

Model opracowany w Medical College of Georgia przez Michała Kucznię [Kuczma et al. 2009] a otrzymany dzięki uprzejmości dr L. Ignatowicza (GHSU, Georgia, USA).

- **myszy C57Bl/6^{GFP} (WT^{GFP})**

Pozyskane w wyniku krzyżowania osobników C57Bl/6 z TCR^{mini}FOXP3^{GFP} w celu uzyskania organizmów o fenotypie typu dzikiego (WT) z możliwością, odróżnienia limfocytów regulatorowych od efektorowych (WT^{GFP})

- **myszy C57Bl/6 (WT)**

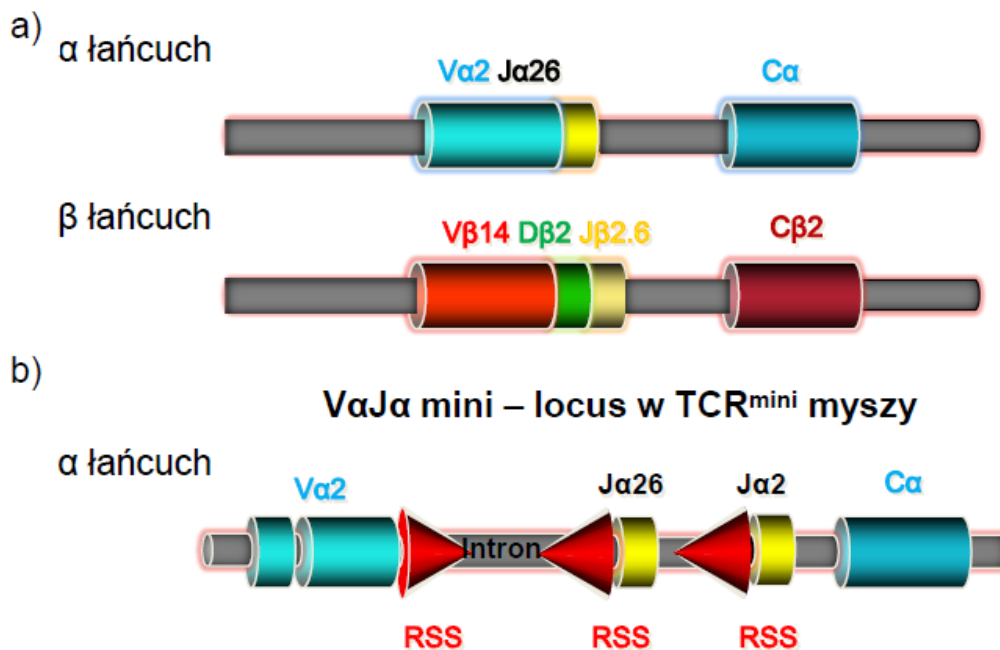
Uniwersalny model badawczy, stosowany jako kontrola w stosunku do myszy genetycznie modyfikowanych. Popularnie zwane „black” od umaszczenia.

Myszy TCR^{mini} zawierają mini repertuar łańcuchów TCR α kodowanych przez V α 2.9 i J α 26 (lub J α 2), związane z jednym zrearanzowanym łańcuchem TCR V β 14 [Pacholczyk et al. 2006]. Następnie myszy TCR^{mini} krzyżowano z osobnikami z niedoborem endogennych loci TCR α i będących heterozygotami dla mini locus TCR α V α 2J α 26J α 2, w celu zapewnienia ekspresji pojedynczego łańcucha TCR α na powierzchni komórki T. Różnorodność repertuaru TCR zależy od regionu CDR3 łańcucha TCR α (Ryc. 6).

Zarówno myszy WT^{GFP} jak i TCR^{mini}FOXP3^{GFP} posiadają gen kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP). Znajduje się ono pod kontrolą promotora dla czynnika transkrypcyjnego Foxp3 co pozwala na łatwe odróżnienie limfocytów regulatorowych (GFP⁺) od efektorowych (GFP⁻).

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach we Wrocławiu, pod numerem zezwolenia

06/2009. Zwierzęta w czasie trwania eksperymentów utrzymywano w warunkach wolnych od drobnoustrojów, SPF (Specific Pathogen Free) w Zwierzętarni IITD PAN we Wrocławiu.



Ryc. 6. Schemat konstrukcji konwencjonalnego transgenicznego receptora TCR: rearanżacja łańcucha α i β (a); TCR α mini – locus generujący ograniczony repertuar z TCR α łańcucha (b). RSS – sekwencja sygnałowa rekombinacji. [Pacholczyk et al. 2006].

3.1.7. Materiał biologiczny

3.1.7.1. Linie komórkowe

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono hodowlę następujących typów komórek:

- **hybrydoma** produkująca przeciwciało moAb anty-GITR (DTA-1). Hybrydomę otrzymano dzięki uprzejmości prof. Shimona Sakaguchi (University of Osaka, Japan). Komórki propagowano w pożywce α MEM z 10% FBS.
- mysia linia komórkowa **czerniaka B16**, otrzymana dzięki uprzejmości dr P. Kraja (GHSU, Georgia, USA). Na powierzchni tych komórek ulega ekspresji zdefiniowany antygen nowotworowy (peptyd Ep63K) w kontekście cząsteczek układu zgodności tkankowej klasy II A^b (A^bEp63K). Dodatkowo

w komórkach tych sprzężono ekspresję antygeny A^bEp63K z ekspresją białka GFP. Hodowla komórek czerniaka odbywała się w pożywce DMEM z 10% FBS. Poziom ekspresji białka GFP (a tym samym i peptydu), na komórkach nowotworowych, był sprawdzany cytofluorymetrycznie przed każdym podaniem do myszy (Ryc. 17b, zdjęcia czerniaka).

- **grasiczak** (tymoma) BW stabilnie transfekowany konstrukcją genową zawierającą promotor dla czynnika transkrypcyjnego NFAT w fuzji z genem dla białka GFP (NFAT^{GFP}). Zastosowany w projekcie w celu unieśmiertelnienia limfocytów T pochodzących z dLN i guza myszy nieleczonych i leczonych DTA-1.
- **hybrydomy** limfocytów T (CD4⁺Foxp3^{GFP-} oraz CD4⁺Foxp3^{GFP+}) poddawano testom swoistości rozpoznania antygeny nowotworowego AbEp63K. Wyselekcjonowane klony były poddawane sekwencjonowaniu regionów CDR3 (TCR α), w celu analizy repertuaru TCR.

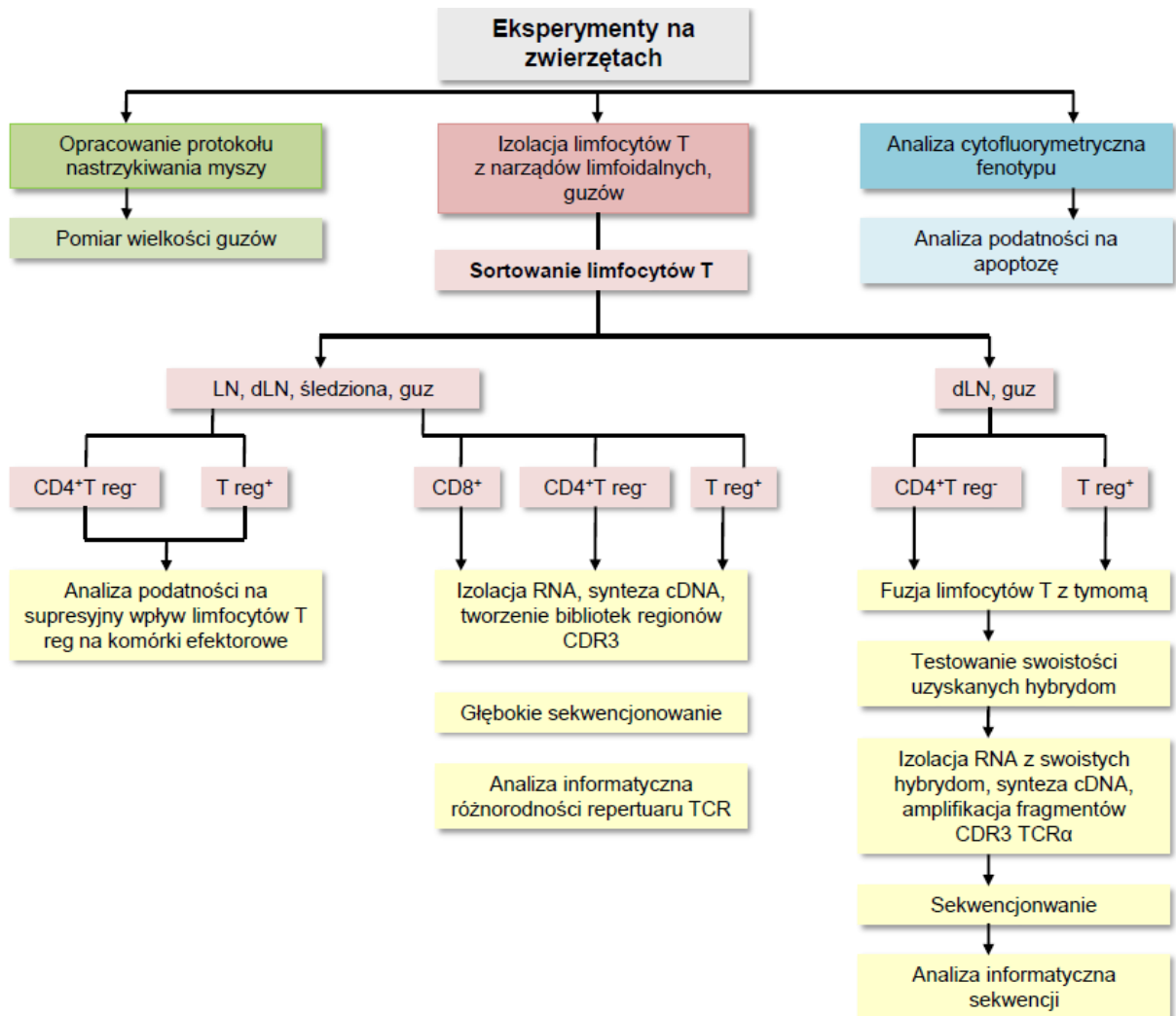
3.1.7.2. Przeciwciało anti-GITR (DTA-1)

DTA-1 jest to monoklonalne, szczurze przeciwciało IgG2b, specyficzne dla mysiego receptora GITR. Otrzymane dzięki uprzejmości prof. Shimona Sakagouchi [Ko et al. 2005].

Pierwszym etapem produkcji przeciwciała DTA-1 było rozpropagowanie komórek hybrydoma produkujących białko. Po kilkutygodniowej hodowli prowadzonej w 37°C i 5% CO₂ supernatant z nad hybrydom odwirowywano i przechowywano w warunkach chłodniczych. W drugim etapie oczyszczano frakcję immunoglobulin poprzez wytrącanie w 45% roztworze siarczanu amonu oraz dializę względem buforu PBS i oczyszczano na złożu powinowactwa z białkiem G. Otrzymane przeciwciało sprawdzano pod względem czystości preparatu za pomocą metody SDS-PAGE i wizualizowano stosując barwienie srebrem. Z kolei aktywność biologiczną uzyskanych immunoglobulin oceniano za pomocą cytometrii przepływowej (efekt blokowania aktywności komercyjnego przeciwciała GITR) oraz podczas eksperymentów *in vivo* na myszach.

3.2. Metody doświadczalne

3.2.1. Schemat eksperymentów



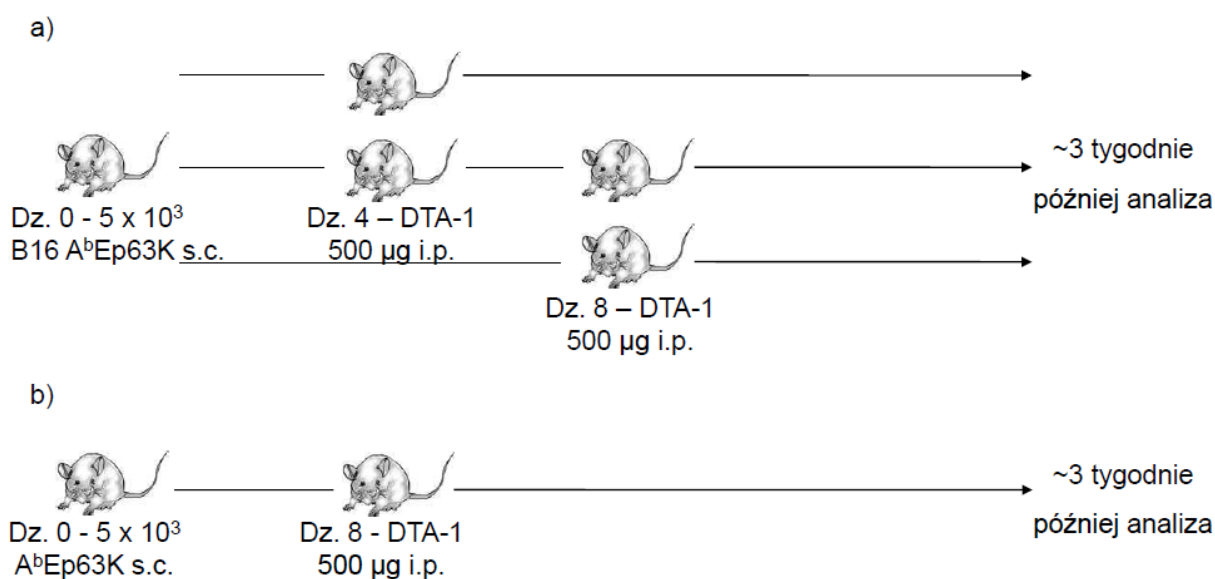
Ryc. 7. Schemat przedstawiający strategię wykonywania eksperymentów.

3.2.2. Eksperymenty na zwierzętach

Opracowano protokół podawania myszom WT^{GFP} oraz TCR^{mini}FOXP3^{GFP} komórek czerniaka B16 A^bEp63K i przeciwciała DTA-1. Schemat eksperymentów ustalono tak, aby umożliwić wzrost guza nowotworowego i wykazać różnice w wielkości guza po zastosowaniu terapii. Przygotowanie komórek czerniaka do podania obejmowało: sprawdzenie ekspresji antygenu Ep63K poprzez pomiar sprzężonej z nim ekspresji

białka GFP na powierzchni komórek za pomocą cytometrii przepływowej, sortowanie komórek o najwyższym poziomie ekspresji peptydu i ich namnożenie *in vitro*, przez 2-3 dni przed wstrzyknięciem.

Cztery grupy myszy WT^{GFP} (3 myszy na/grupę) nastrzyknięto 5 x 10³ komórek B16 A^bEp63K podskórnie (s.c). Po 4 i 8 dniach grupy potraktowano przeciwciałem DTA-1 (i.p. 500 µg/mysz). Z kolei dwie grupy myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} nastrzyknięto 5 x 10³ komórek B16 A^bEp63K s.c., 8 dnia podano przeciwciało DTA-1. Myszy nastrzykiwano komórkami nowotworowymi pod fałd skórny lewej pachwiny. W trakcie eksperymentów ustalono kinetykę wzrostu guza nowotworowego u myszy nieleczonych i poddanych terapii przeciwciałem DTA-1. Pomiar wielkości guza wykonywano przeżyciowo w odstępie 3 dni za pomocą suwmiarki. Dane liczbowe zebrano i uśredniono. Zakończenie eksperymentu odbywało się pomiędzy 20 a 25 dniem od rozpoczęcia procedury. Schemat poglądowy przebiegu eksperymentów przedstawia rycina 8.



Ryc. 8. Schemat przebiegu eksperymentów na myszach a) WT^{GFP} i b) TCR^{mini}FOXP3^{GFP}.

3.3. Metody pozyskiwania limfocytów T

3.3.1. Izolacja limfocytów T z narządów limfatycznych

Wszystkie przeprowadzone eksperymenty trwały ok. 3 tygodni. Po tym czasie uśmiercano zwierzęta. Kolejnym etapem było pobranie węzłów chłonnych (odległe węzły chłonne (cLN), strażnicze węzły chłonne (dLN) oraz śledzion (SPL) z myszy nie leczonych, leczonych oraz kontrolnych (zdrowych). Wyizolowane organy umieszczano na lodzie w roztworze PBS z dodatkiem 2% surowicy płodowej (bufor płuczający). Zawiesinę komórkową powstałą z roztarcia organów w w/w buforze precedzono przez gazę nylonową o wielkości porów 100 mikrometrów i zawieszano w 5 ml objętości buforu płuczającego. Tak przygotowane preparaty wirowano 5 min/ 1200 obr./ 4°C. Po wirowaniu usuwano supernatant, komórki zawieszano w objętości 1-2 ml i przepuszczano przez filtr nylonowy 70 mikrometrów umieszczony na 5 ml probówce testowej (Tube with cell strainer cap, 35 µm, BD Falcon) w celu utworzenia zawiesiny pojedynczych komórek. Tak otrzymane komórki pozostawiano na lodzie do dalszych analiz.

W przypadku śledzion zastosowano dodatkowy etap w preparacji komórek. Po roztarciu organów, do suchego osadu komórek, dodawano 3-5 ml buforu ACK a następnie inkubowano 5 min/ temp. pok. Ten etap miał na celu usunięcie erytrocytów z masy komórkowej. Po inkubacji preparaty wirowano 5 min/ 1200 obr. / 4°C. Etap wirowania powtórzono ponownie z zastosowaniem buforu płuczającego w celu dokładnego wypłukania roztworu ACK. Po wirowaniu usuwano supernatant, komórki zawieszano w objętości 1-2 ml i przepuszczano przez filtr w celu utworzenia zawiesiny pojedynczych komórek. Tak przygotowane komórki były gotowe do dalszych analiz.

3.3.2. Izolacja limfocytów T z organów nie limfatycznych

Razem z organami limfatycznymi pobierano również guzy nowotworowe. Sposób preparacji przebiegał następująco. Wykonywano pomiar masy guza nowotworu i przenoszono na szalkę umieszczoną na lodzie. W celu ułatwienia roztarcia guza cięto go nożyczkami na mniejsze fragmenty. W obecności roztworu PBS z dodatkiem 2%

surowicy płodowej rozcierano komórki i przepuszczano przez filtr 100 μm (Cell Strainer, BD Falcon) do 50 ml falkonu. Całość zawiesiny dopełniano buforem ACK w celu lizy erytrocytów. Tak przygotowane preparacje komórkowe inkubowano 5 min / temp. pok. Następnie wirowano 5 min/ 1200 obr./ 4°C. Etap wirowania powtórzono ponownie z zastosowaniem PBS z dodatkiem 2% surowicy płodowej. Po usunięciu supernatantu zawiesinę komórkową przepuszczono przez filtr 70 μm (Cell Strainer, BD Falcon), a następnie zawieszano w objętości 1-2 ml w celu utworzenia zawiesiny pojedynczych komórek. Tak przygotowane komórki pozostawiano na lodzie do dalszych analiz.

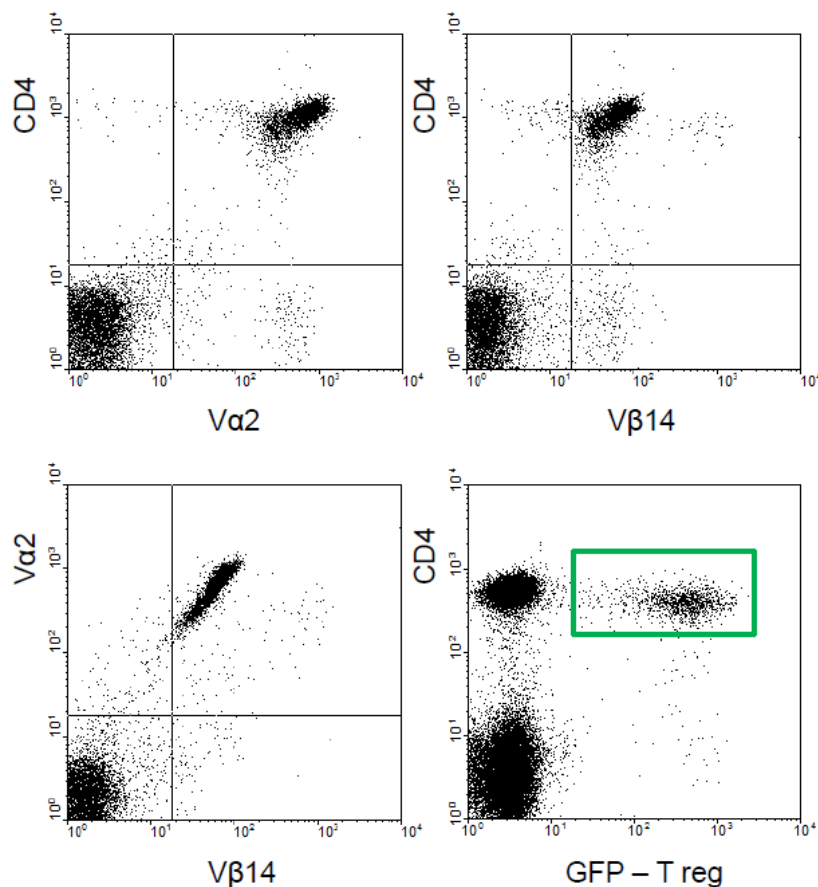
3.4. Metody cytofluorymetryczne

3.4.1. Analiza cytofluorymetryczna fenotypu

Wszystkie analizy cytofluorymetryczne wykonano przy użyciu aparatu FACS Calibur (BD Biosciences). Miały one na celu dokonanie oceny fenotypu myszy nie leczonych, poddanych terapii przeciwciałem DTA-1 oraz myszy kontrolnych. Do barwień zewnątrzkomórkowych użyto przeciwciał monoklonalnych zestawionych w tabeli 7. Barwienia wykonywano na okrągłodennej płytce 96-dołkowej lub w 1,5 ml probówkach typu eppendorf. Do analiz użyto od 300 tys. do 2 mln wyizolowanych komórek (w zależności od organu). Zawiesiny komórek umieszczano na płytce bądź w probówkach typu eppendorf, wirowano 3 min/1200 rpm/4°C. Po usunięciu supernatantów dodawano przeciwciała o wcześniej ustalonym stężeniu w objętości 50-100 μl na próbkę. Wszystkie mieszaniny przeciwciał zawieszano w buforze PBS z dodatkiem 2% surowicy płodowej. Następnie komórki z przeciwciałami inkubowano przez 20 min/ na lodzie/ w ciemności. Po zakończeniu inkubacji próbki 2-krotnie płukano w objętości po 200 μl . Każdy etap płukania obejmował również wirowanie przez 3 min/1200 rpm/4°C. Po usunięciu supernatantów komórki zawieszano w objętości 200-300 μl PBS z dodatkiem 2% surowicy płodowej. Tak przygotowane komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego. Uzyskane dane opracowywano w programie komputerowym Win MDI.

3.4.2. Cytometryczny genotypowanie myszy transgenicznych

Do genotypowania myszy transgenicznych wykorzystano technikę cytometrii przepływowej. W celu wykluczenia obecności endogennych łańcuchów V α 2 oraz V β 14 nie pochodzących z trans genu, zastosowano koktajl przeciwciał: CD4 APC, V α 2 PE, V β 14 FITC. Dzięki takiemu zestawowi barwień możliwa była również detekcja komórek regulatorowych posiadających gen kodujący białko GFP znajdujące się pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego Foxp3 (Ryc. 9).

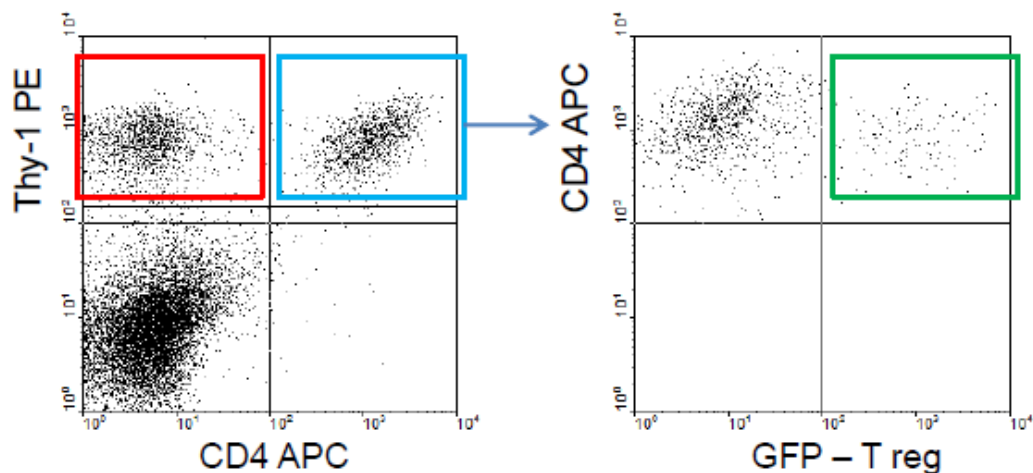


Ryc. 9. Analiza cytometryczna mini repertuaru oraz fenotypu myszy TCR^{mini}FOXP3^{GFP}

Barwienia wykonywano na okrągłodennej płytce 96-dołkowej. Materiał do analizy pochodził z mysiej krwi pobranej z żyły ogonowej. Krew w objętości 50 μ l zbierano do 1,5 ml probówek eppendorf zawierających 100 μ l roztworu PBS z EDTA. Podobnie jak w przypadku śledzion wykonywano dodatkowy etap lizy erytrocytów za pomocą odczynnika ACK. Dalszy etap postępowania był zgodny ze standardowym protokołem barwienia opisanym wyżej.

3.4.3. Sortowanie komórek

W celu wysortowania limfocytów T wykonywano wcześniej opisane etapy izolacji komórek z narządów limfoidalnych (cLN, dLN, SPL) i organów nie limfoidalnych (guzy nowotworowe) myszy nie leczonych, leczonych i kontrolnych. Następnie barwiono komórki odpowiednimi mieszaninami przeciwciał. Po wykonaniu barwienia i 2 krotnym płukaniu, komórki zawieszano w objętości 3-4 ml buforu płuczącego. Sortowanie wykonywano przy użyciu sortera komórkowego ARIA (BD Biosciences). Komórki zbierano do 5 ml probówek typu falkon wypełnionych 200 μ l surowicy płodowej. Po wypłukaniu surowicy rozseparowane subpopulacje limfocytów T tj. CD4⁺T reg⁻, T reg⁺, CD8⁺ zbierano w celu utworzenia bibliotek regionów CDR3, wykonania testów funkcjonalnych oraz produkcji hybridom. Komórki przygotowane do sekwencjonowania Ion Torrent wirowano i zawieszano w roztworze RLT (odczynnik zestawu RNAeasy mini kit) w objętości 350 μ l na 1 mln komórek. Tak przygotowane preparacje mrożono w temperaturze -80°C. Strategia sortowania została zmieniona w przypadku preparacji limfocytów T z guza nowotworowego. Utrudnienia związane były z odpowiednim doбором koniugatów fluorescencyjnych przeciwciał (Ryc. 10).



Ryc. 10. Schemat bramkowania sortowanych populacji z guza nowotworowego.

3.5. Tworzenie hybridom limfocytów T

Tworzenie hybridom limfocytów T pochodzących z węzłów drenujących i infiltrujących guzy nowotworowe wykazujące specyficzność wobec antygeny

A^bEp63K wykonano w oparciu o technikę fuzji błon komórkowych z użyciem glikolu polietylenowego (PEG). Przy użyciu sortera komórkowego ARIA wyizolowano z węzłów drenujących komórki T-regulatorowe i T-efektorowe, które pochodziły zarówno z myszy nie leczonych jak i leczonych przeciwciałem DTA-1. Ze względu na ograniczoną ilość pozyskanego materiału otrzymane komórki były namnażane *in vitro*. W trakcie hodowli obie populacje limfocytów T otrzymywały IL-2, która stymulowała ich wzrost. Dodatkowo płytki hodowlane opłaszczano przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD28, w celu aktywacji receptora TCR. Po uzyskaniu odpowiedniej puli komórek znajdujących się w logarytmicznej skali wzrostu wykonano ich fuzję.

3.5.1. Fuzja

Fuzji aktywowanych limfocytów T przeprowadzono z komórkami grasiczaka BW NFAT^{GFP}. Zarówno limfocyty jak i komórki grasiczaka policzono i zmieszano w stosunku 5:1 (grasiczak:limfoblasty). Do fuzji użyto min. 10 mln komórek BW NFAT GFP. Mieszaninę dwukrotnie odpłukano w objętości po 50 ml w pożywce α MEM (pożywka hodowlana, bez surowicy) poprzez wirowanie w 1200 rpm/ 5 min. Etap ten miał na celu dokładne usunięcie surowicy z pożywki hodowlanej, która powoduje obniżenie wydajności fuzji. Następnie przygotowano mieszaninę PEG i α MEM w stosunku 1:1 (1 ml mieszaniny na 1 fuzję). Mieszaninę tę ogrzano do temperatury 37°C. Po drugim odpłukaniu komórek pożywka hodowlana została usunięta a osad komórkowy delikatnie rozbito. Probówkę z komórkami przeniesiono do zlewki zawierającej wodę miliQ, którą również ogrzano do temperatury 37°C. W kolejnym etapie dodano mieszaninę PEG/ α MEM do komórek i jednocześnie pipetowano przez 15 s. Następnie pozostawiono probówkę z mieszaniną komórek i PEG w zlewce na 1,5 min, jednocześnie delikatnie nią obracając. Po upływie wyznaczonego czasu w ciągu 30 s. dodano 1 ml czystego α MEM, potem 2 ml w ciągu kolejnych 30s, 3ml - 30s, 4ml - 30s. Na koniec dodano 40 ml pożywki hodowlanej i zamieszano delikatnie probówką przez inwersję. Tak przygotowane komórki inkubowano w 37°C przez 5 min. Następnie komórki odwirowano przy 1000 rpm/5 min. i odpłukano w 50 ml czystego α MEM. Po usunięciu pożywki hodowlanej, zawieszono komórki w 10 ml pełnej pożywki. Tak uzyskana zawiesina komórkowa została rozcieńczona do 60x i rozprowadzona na 96-dołkowych płaskodennych płytkach (Corning) w objętości 100

μl/dołek. Płytki umieszczono w cieplarni w temp. 37°C i 5% CO₂. Po 24h inkubacji dodano do każdego dołka 50 μl pożywki hodowlanej, selekcyjnej HAT. Tak przygotowane komórki pozostawiono w hodowli przez ok. 2 tyg. monitorując wzrastanie nowych kolonii. Za pomocą cytometrii przepływowej analizowano hybrydomy pod kątem obecności receptora CD4 i TCRβ. Klony komórkowe były rozpropagowane na płytki 24 dołkowe i mrożone w ciekłym azocie.

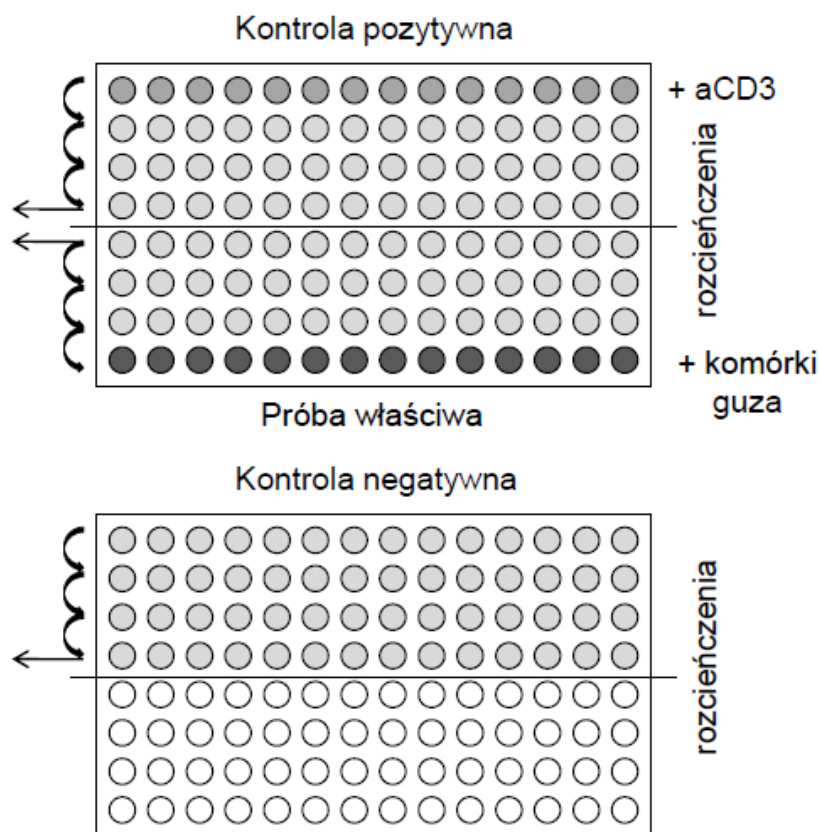
3.5.2. Testy swoistości hybrydom

Po wyprowadzeniu jednorodnych linii hybrydom rozpoczęto etap testowania wyselekcjonowanych klonów na zdolność do odpowiedzi wobec peptydu Ep63K. W tym celu wykorzystano dwa testy: ELISA oraz test HT-2.

Zanim zastosowano metodę ELISA wybrane klony poddano stymulacji przeciwciałem anti-CD3, aby ocenić ich zdolność odpowiedzi po stymulacji receptora TCR. W tym celu opłaszczano 96-dołkowe płaskodenne płytki przeciwciałami anti-CD3 w stężeniu 10μg/ml (w objętości 100 μl buforu PBS). Czas inkubacji wynosił 1 h w 37°C lub przez noc w 4°C. Następnie 3-krotnie przepłukiwano płytki buforem PBS i nakładano komórki danego klonu hybrydom w liczbie 100tys./dołek w 200 μl pożywki hodowlanej. Te same klony stymulowano również za pomocą zawiesiny komórek pochodzących z guzów nowotworowych myszy nie leczonych, którym podano komórki czerniaka B16 A^bEp63K. Stymulację przeprowadzano na 96-dołkowych, płaskodennych płytkach stosując 100 tys. komórek danego klonu oraz 400 tys. komórek z guza na osobny dołek. Po 8h inkubacji zarówno płytki z hybrydomami stymulowane przez anti-CD3 jak i przez komórki nowotworowe odwirowywano w 1300 rpm/5min. Zabieg ten miał na celu osadzenie masy komórkowej i uzyskanie klarownego supernatantu. Pożywkę hodowlaną z nad komórek zbierano do oddzielnych 0,5 ml probówek i zabezpieczano przed utratą aktywności poprzez mrożenie w temperaturze -20°C.

Test płytkowy ELISA wykonano przy użyciu komercyjnego zestawu odczynników Novex mouse IL-2 ELISA kit (Life Technologies, Carlsbad, USA), zgodnie z procedurą określoną przez producenta. W tej metodzie poziom odpowiedzi danej hybrydomy wobec peptydu był powiązany z produkcją IL-2. Test odczytano przy

ustalanej długości fali absorbancji za pomocą czytnika płytek Viktor X5 (Perkin Elmer). Kontrolę pozytywną stanowiły supernatanty znad hybridom stymulowanych anty-CD3, kontrolę negatywną stanowiła pożywka hodowlana znad hybridom nie stymulowanych, a próbę właściwą stanowiły supernatanty znad klonów stymulowanych zawiesiną komórek guza nowotworowego. Zgodnie z procedurą zastosowano 6 punktową krzywą wzorcową stężeń IL-2, do której porównywano otrzymane wartości. W celu weryfikacji wyników pochodzących z testu ELISA dodatkowo wykonano test HT-2. HT-2 są to komórki indykatorowe, które do prawidłowego wzrostu potrzebują IL-2. Pierwszym etapem było rozpropagowanie wybranych klonów hybridom na płaskodenną płytkę 96-dołkową (Ryc. 11) po 100 tys./dołek. Kontrolną negatywną stanowiły hybridomy zawieszane w samej pożywce hodowlanej, próbę właściwą stanowiły hybridomy z mieszaniną komórek pochodzących z przetartego guza nowotworowego (po 300 tys./dołek), kontrolę pozytywną stanowiły hybridomy zawieszane w samej pożywce, ale położone na dołkach opłaszczonych przeciwciałem anty-CD3 (w stężeniu 10 µg/ml). Po nałożeniu komórek na dołki płytki odwirowano w 1000 rpm/5 min i pozbyto się pożywki. Płytkę zawierającą kontrolę negatywną i pozytywną zawieszono w 250 µl nowej pożywki. Płytkę zawierającą próbki właściwe zawieszono w 150 µl pożywki i dodano mieszaniny przetartych komórek guza nowotworowego w objętości 100 µl/dołek. Następnie pozostawiono płytki w hodowli przez 24 h w 37°C. Po 24 h inkubacji płytki odwirowano w 1000 rpm/5 min, aby osadzić komórki na dnie dołków, rozpipetowano na puste dołki po 80 µl nowej pożywki, po czym przeniesiono po 80 µl supernatantu znad hybridom do nowo napełnionych dołków zawierających pożywkę hodowlaną i wykonano serię rozcieńczeń. W międzyczasie przygotowano komórki HT-2 w objętości 20 µl/dołek. Etap ten miał na celu 2-krotne odpłukanie komórek w 50 ml probówce typu falkon w roztworze PBS w celu usunięcia IL-2. Tak zawieszane w pożywce hodowlanej komórki HT-2 nakładano po 20 µl na dołki zawierające rozcieńczenia. Dodatkowo wykonano kontrolę jakości testu w postaci serii rozcieńczeń w pożywce komercyjnej, rekombinowanej IL-2, w obecności komórek HT-2. Na tym etapie pozostawiono płytki w hodowli przez 24 h w 37°C. Po zakończeniu inkubacji dokonano analizy wzrokowej. Pozytywnie oceniano te rozcieńczenia hybridom, w których komórki HT-2 uległy namnożeniu, co oznaczało, że w pożywce obecna była IL-2 niezbędna do przeżycia tych komórek.



Ryc. 11. Schemat poglądowy wykonania testu HT-2.

Jeśli IL-2 nie została wytworzona w wyniku stymulacji hybrydomy, komórki HT-2 obumierały. Analizę wzrokową zweryfikowano z testem MTS. Test MTS oparty jest na zdolności enzymu dehydrogenazy mitochondrialnej do przekształcania rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej (MTS) do formazanu będącego barwnym produktem tej reakcji. Zdolność do produkcji formazanu mają tylko żywe komórki, co pozwala na szybkie i dokładne określenie odsetka komórek z funkcjonalnymi mitochondriami oraz wpływu badanego czynnika na żywotność dowolnej linii komórkowej. Testy wykonano poprzez dodanie reagentu bezpośrednio do hodowli komórkowej (20µl/dolek), inkubacji do 4 h w cieplarni i pomiarze absorbancji za pomocą czytnika płytek Viktor Wallac X5.

3.6. Metody biologii molekularnej dotyczące DNA i RNA

3.6.1. Izolacja genomowego DNA z ogonów

Izolacja DNA genomowego z mysich ogonów rozpoczyna się od strawienia materiału biologicznego poprzez dodanie 200 µl buforu zawierającego 15 µl proteiny K na ogonek. Tak przygotowana próbka umieszczana jest w termomikserze, w temp. 56 °C, na noc (lub minimum 4 h). Po inkubacji materiał jest wirowany 2 min, przy maximum obrotów 10000 rcf. Z próbki pobierane jest 150 µl zawiesiny i przenoszone do nowej próbki typu eppendorf, do której dodajemy 2 objętości próbki 96% etanolu lub 1 objętości izopropanolu. Po intensywnym mieszaniu próbki są wirowane 5 min./ 10000 obr., następnie etanol jest odciągany. Do osadu dodawane jest 500µl 75% etanolu i próbki są wirowane przez 5 min./ 10000 rcf. Po wirowaniu plyn znad osadu jest zlewany a wyprecypitowane DNA zawieszane w wodzie miliQ i suszone w 56 °C/ ok. 30 min. W przypadku małej ilości osadu wyizolowane DNA zawieszają się w niewielkiej ilości wody miliQ (20 µl). Dobrze widoczny osad zawieszają się w 150 µl/próbkę, wytrząsają i pozostawiają na noc w temp. 4°C lub -20°C. Tak przygotowana matryca DNA jest gotowa do genotypowania.

3.6.2. Genotypowanie myszy transgeniczných

Podczas genotypowania myszy transgeniczných TCR^{mini}FOXP3^{GFP} wykorzystano również metody biologii molekularnej. Analiza ta miała potwierdzić obecność transgenów tworzących mini repertuar oraz obecność białka GFP u myszy. W tym celu wykonano reakcje PCR przy użyciu w/w starterów (Tabela 12) oraz następujące odczynniki:

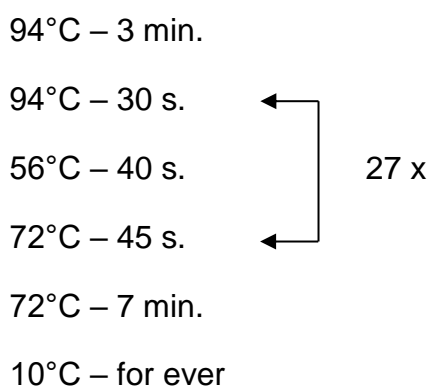
10 x bufor – 2 µl
mAct_s 10mM – 0,8 µl
mAct_rev 10mM – 0,8 µl
Starter 1 10mM – 0,8 ul
Starter 2 10mM – 0,8 ul
dNTP – 0,4 µl
MgCL₂ – 1,4 ul

Polimeraza Allegro – 0,2 μ l

MiliQ – 11,8 μ l

Matryca – 1 μ l

W każdej z reakcji zastosowano podwójny zestaw starterów pozwalający na detekcję jednocześnie transgenu i genu aktywny, za pomocą której sprawdzana była jakość użytej matrycy. DNA wykorzystane do testów pochodziło z fragmentu ogonów, z których izolowano genomowy DNA. Warunki prowadzenia reakcji zoptymalizowano a proces prowadzono wg poniższego schematu:



Wielkość otrzymanych produktów wynosiła dla aktywny: ~ 700 bp., V α 2: 520 bp., V β 14: 215 bp., GFP: 530 bp.

3.6.3. Izolacja RNA z limfocytów T

Do izolacji całkowitego RNA wykorzystano gotowe zestawy firmy Qiagen (RNeasy Mikro Kit oraz RNeasy Mini Kit). Postępowano zgodnie z zaleceniami producenta. Preparację wykonano na: wysortowanych limfocytach T oraz klonach hybrydom T specyficznych wobec peptydu Ep63K zawieszonych w roztworze RLT i przechowywanych w temp -80°C. Każda próbka została zabezpieczona przed degradacją RNA poprzez dodanie inhibitora RNazy (RNase OUT - 0,5 μ l/ próbkę). Po wykonaniu procedury izolacji osady RNA zawieszano w buforze TE lub w wodzie miliQ w objętości 20 μ l. W otrzymanych próbkach mierzono zawartość RNA za pomocą spektrofotometru Nanodrop. Tak przygotowany materiał przechowywano w temp. -20°C.

3.6.4. Synteza cDNA

Etap syntezy cDNA wykonano stosując odwrotną transkryptazę SuperScript III (ThermoFisher scientific). Do reakcji wykorzystano następujące odczynniki, stanowiące gotową mieszaninę (po 10 μ l na próbkę):

10 x bufor – 4 μ l
DTT – 2 μ l
Odwrotna transkryptaza – 1 μ l
Woda miliQ – 3 μ l

Zawartość mieszaniny wytrząsano, wirowano, pozostawiono na lodzie.

Próbki RNA po podgrzaniu w temp. 65°C przez 5 min. wirowano i przenoszono na lód, na którym były inkubowane 2 min. Następnie przygotowano matrycę (po 10 μ l na próbkę) zawierającą:

dNTP – 2 μ l (0,2mM)
Starter TCR CA3 2 μ M – 1 μ l
RNA – 7 μ l

Po dodaniu do mieszaniny cDNA, zawartość wortexowano i wirowano. Reakcję PCR przeprowadzono w następujących warunkach:

50°C – 50 min.
70°C – 15 min.
10°C – for ever

Otrzymane cDNA przechowywano w temp. -20°C.

3.7. Metody rozdzielania i oczyszczania DNA

3.7.1. Elektroforeza DNA genomowego

Elektroforezę DNA prowadzono w aparacie do elektroforezy horyzontalnej. Podczas rozdzielania wykorzystywano żel agarozowy (0,75-2%) z dodatkiem bromku etydyny w stężeniu 0.5 μ g/ml, zanurzony w buforze 1xTAE, przy stałym napięciu 90V. Do każdej z próbek zawierających DNA (16 μ l objętości) dodawano 4 μ l, 5-krotnie stężonego buforu

obciążającego. Tak otrzymaną mieszaninę dokładnie przepipetowano i nakładano do kieszonek w żelu. W celu prawidłowego odczytu otrzymanych, w wyniku rozdziału, prążków DNA stosowano marker mas DNA. Po zakończeniu rozdziału, żel analizowano w świetle lampy UV i fotografowano w aparacie do analizy żeli.

3.7.2. Elucja DNA z żelu agarozowego

Oczyszczenie DNA z żelu agarozowego prowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu GeneJET Gel Extraction Kit, zgodnie z instrukcją producenta.

Fragment DNA wycinano z żelu pod lampą UV, przy pomocy skalpela. Wycięty prążek zawierający DNA inkubowano w 3 objętościach buforu wiążącego (Binding Buffer) do momentu całkowitego rozpuszczenia, w temp. 56°C. Do otrzymanej mieszaniny dodano równą objętość izopropanolu i naniesiono na kolumnę GeneJET purification column, odwirowano 12000g/ 1min/ w temp. 4°C. Otrzymany przesącz wylewano. Następnie dodano 700µl buforu do przemywania (Wash Buffer) i 2-krotnie powtórzono procedurę wirowania. Kolumnkę umieszczono w świeżej probówce i eluowano DNA wodą dejonizowaną MiliQ (o temp 37°C). Wirowanie wykonywano w tych samych warunkach co poprzednio. Finalnie otrzymaną zawiesinę DNA zabezpieczano w temp. -20°C lub wykorzystywano w bieżących eksperymentach.

3.7.3. Oczyszczanie produktów reakcji PCR z mieszaniny poreakcyjnej

Do oczyszczenia produktów reakcji PCR wykorzystano, zgodnie z instrukcją producenta, komercyjny zestaw GeneJet PCR Purification Kit. Mieszaninę poreakcyjną zawieszano w buforze wiążącym (Binding Buffer) w stosunku 1:1 i nakładano na kolumnkę GeneJET purification column, następnie wirowano 12000g/ 1min/ 4°C i usuwano przesącz. Kolejnym etapem było przemywanie materiału na kolumnie, poprzez dodanie 700µl buforu do przemywania (Wash Buffer) i 2-krotne powtórzenie procedury wirowania. Po zakończeniu płukania, kolumnkę przenoszono do świeżej próbki a DNA eluowano wodą dejonizowaną MiliQ (o temp

37°C) i wirowano w tych samych warunkach. Otrzymywano oczyszczone DNA, które wykorzystywano do kolejnych reakcji PCR.

3.8. Tworzenie bibliotek regionów CDR3

Analizę locus TCR^{mini}Foxp3^{GFP} Vα2Jα26Jα2 u myszy z nowotworem, nieleczonych i leczonych przeciwciałem DTA-1, rozpoczęto od wyizolowania za pomocą sortera komórkowego populacji limfocytów T: CD4⁺ Foxp3^{GFP+}, CD4⁺ Foxp3^{GFP-}, CD8 (stopień oczyszczenia > 98%). Do otrzymania bibliotek wykorzystano cDNA pochodzące z RNA izolowanego z narządów limfatycznych (odległe LN, strażnicze LN, śledziony) i organów nie limfoidalnych (guzy nowotworowe). Przepisywanie mRNA do cDNA odbywało się z udziałem specyficznego startera Cα (5'-TCGGCACATTGATTTGGGAGTC-3').

Pierwszym etapem preparacji bibliotek była synteza drugiej nici cDNA. Mieszaninę reakcyjną przygotowano z pomocą systemu zawierającego wysoko wierną polimerazę AccuPrime™ Taq DNA (ThermoFisher Scientific). W skład mieszaniny wchodziły następujące odczynniki:

10 x bufor – 2 μl
Starter Vα2_88s 2 μM – 1 μl
Polimeraza Accuprime – 0,5 μl
dNTP – 0,5 μl
MiliQ – 6 μl

Do 10 μl mieszaniny dodano 10-krotnie rozcieńczone cDNA.

Reakcję PCR wykonano w następujących warunkach:

94°C – 2 min.
94°C – 10 s. ←
50°C – 10 s. ← 2 x
68°C – 30 s. ←

94°C – 10 s. ←
 59°C – 10 s. ← 3 x
 68°C – 30 s. ←
 72°C – 1 min.
 10°C – for ever

Otrzymany produkt reakcji służył jako matryca do wykonania 2 reakcji PCR. W skład mieszaniny wchodziły następujące odczynniki:

10 x bufor – 2,5 µl
 Starter ITAdBCA1 10 µM – 1 µl
 Polimeraza Accuprime – 0,5 µl
 dNTP – 0,5 µl
 MiliQ – 13,5 µl
 MgCl₂ – 1 µl

Do 19 µl mieszaniny dodano 5 µl matrycy DNA oraz drugi 10 µM starter o objętości 1 µl zawierający indywidualny znacznik dla każdej próbki (populacji limfocytów T) o 8 nukleotydowej sekwencji znakującej tzw. TAG. (Tabela 12). Reakcję PCR wykonano w następujących warunkach:

94°C – 2 min.
 94°C – 10 s. ←
 50°C – 10 s. ← 2 x
 68°C – 30 s. ←
 94°C – 10 s. ←
 58°C – 10 s. ← 28 x
 68°C – 30 s. ←
 72°C – 3 min.
 10°C – for ever

Wielkość otrzymanych produktów wynosiła ~200 p.z.

W celu weryfikacji poprawności wytworzonych bibliotek wykonywano testy sprawdzające obecność otrzymanych produktów oraz ich jakość. Były to:

1. Elektroforeza na 2 % żelu agarozowym sprawdzająca obecność otrzymanych produktów.
2. Kontrolne reakcje PCR sprawdzające właściwe przyłączenie się starterów oraz namnożenie matrycy.

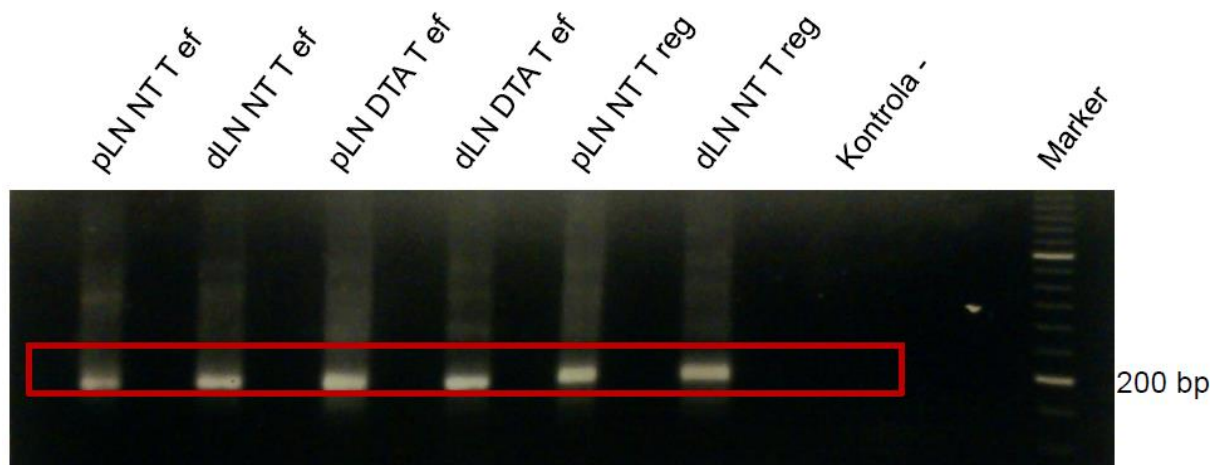
W przypadku sprawdzenia właściwego przyłączenia się starterów wykonano 2 niezależne od siebie reakcje PCR. W pierwszej zastosowano startery ITAdA i ITAdB, zaś w drugiej TCRCA1 oraz Vα2_235. Reakcje PCR przeprowadzono z zastosowaniem takich samych odczynników oraz w identycznych warunkach:

10 x bufor – 2 μ l
Starter 1 10 μ M – 1 μ l
Starter 2 10 μ M – 1 μ l
Polimeraza Accuprime – 0,3 μ l
dNTP – 0,5 μ l
MiliQ – 14,7 μ l

Do 19,5 μ l mieszaniny dodano 0,5 μ l matrycy DNA (biblioteki). Warunki reakcji:

94°C – 2 min.
94°C – 10 s. ←
58°C – 10 s. ← 35 x
68°C – 30 s. ←
72°C – 1 min.
10°C – for ever

Wielkość otrzymanych produktów wynosiła ~ 200 p.z. (Ryc. 12).



Ryc. 12. Przykładowa biblioteka z przyłączonymi znacznikami (tagami), przed wycięciem z żelu i oczyszczeniem na kolumnkach.

Na sprawdzonych w ten sposób produktach reakcji PCR (bibliotekach regionów CDR3) wykonywano rozdział elektroforetyczny przy 2 % żelu agarozowego, ~ 50 V i czasie trwania 4-5 h. Następnie izolowano DNA z żelu i oczyszczano przy użyciu zestawu odczynników, zgodnie z instrukcją producenta. Dokładne stężenie produktów określono przy użyciu spektrofotometru nanodrop. Do sekwencjonowania przygotowano jedną, zbiorczą próbkę będącą mieszaniną otrzymanych wcześniej bibliotek. Ilość oraz stężenie użytego DNA zostało tak dobrane, aby zapewnić optymalną ilość kopii produktu, określonej przez producenta a pochodzącej z odrębnych próbek.

Głębokie sekwencjonowanie regionów CDR3 na platformie Ion Torrent zostało wykonane przez zewnętrzną firmę Edge BioSystems (Gaithersburg, USA). Metodę tą przeprowadzono w 2 niezależnych od siebie eksperymentach.

3.9. Tworzenie bibliotek regionów CDR3 z hybrydom limfocytów T

Pierwszym etapem otrzymania bibliotek regionów CDR3 z hybrydom limfocytów T była reakcja syntezy cDNA (uprzednio opisana). W tym celu wykorzystano tylko te klony, które wykazywały specyficzność wobec peptydu Ep63K. Materiałem do uzyskania nici cDNA było RNA pochodzące z subpopulacji limfocytów T

(CD4⁺ oraz CD4⁺T reg⁻) wyizolowanych ze strażniczych LN myszy nie leczonych i leczonych.

Kolejnym etapem preparacji było wykonanie amplifikacji fragmentu CDR3 TCR α o długości ~200 pz. za pomocą reakcji PCR. Wykorzystano w tym celu metodę zagnieżdżonego PCR (Nested PCR). Produkt amplifikacji uzyskany w pierwszej reakcji stanowił matrycę powielaną w drugim PCR, w którym wykorzystano specjalnie zaprojektowane pary starterów wewnętrznych zlokalizowanych wewnątrz powielonego fragmentu DNA. Mieszaniny reakcyjne przygotowano z udziałem polimerazy AccuPrime™ Taq DNA z zastosowaniem takich samych odczynników oraz w identycznych warunkach. Do pierwszej reakcji użyto:

Starter V α 288 10 μ M – 1 μ l
Starter TCR CA3 10 μ M – 1 μ l
Polimeraza Accuprime – 0,3 μ l
dNTP – 0,5 μ l
MiliQ – 14,7 μ l
MgCL₂ – 1 μ l

Do 19,5 μ l mieszaniny dodano 0,5 μ l matrycy cDNA. Warunki reakcji:

94°C – 2 min.
94°C – 10 s. ←
57°C – 10 s. ← 30 x
72°C – 50 s. ←
72°C – 1 min.
10°C – for ever

Uzyskano produkt o wielkości 400 pz. Następnie wykonano rozdział elektroforetyczny w 2 % żelu agarozowym w celu wizualizacji otrzymanych produktów oraz wyizolowaniu fragmentu DNA będącego matrycą dla drugiej reakcji zagnieżdżonego PCR. Do drugiej reakcji PCR użyto:

Starter V α 2.66 10 μ M – 1 μ l
Starter TCR CA1 10 μ M – 1 μ l
Polimeraza Accuprime – 0,3 μ l

dNTP – 0,5 μ l

MiliQ – 14,2 μ l

MgCl₂ – 1 μ l

Do 19 μ l mieszaniny dodano 1 μ l DNA (10 krotnie rozcieńczone). Zastosowano te same warunki reakcji jak poprzednio.

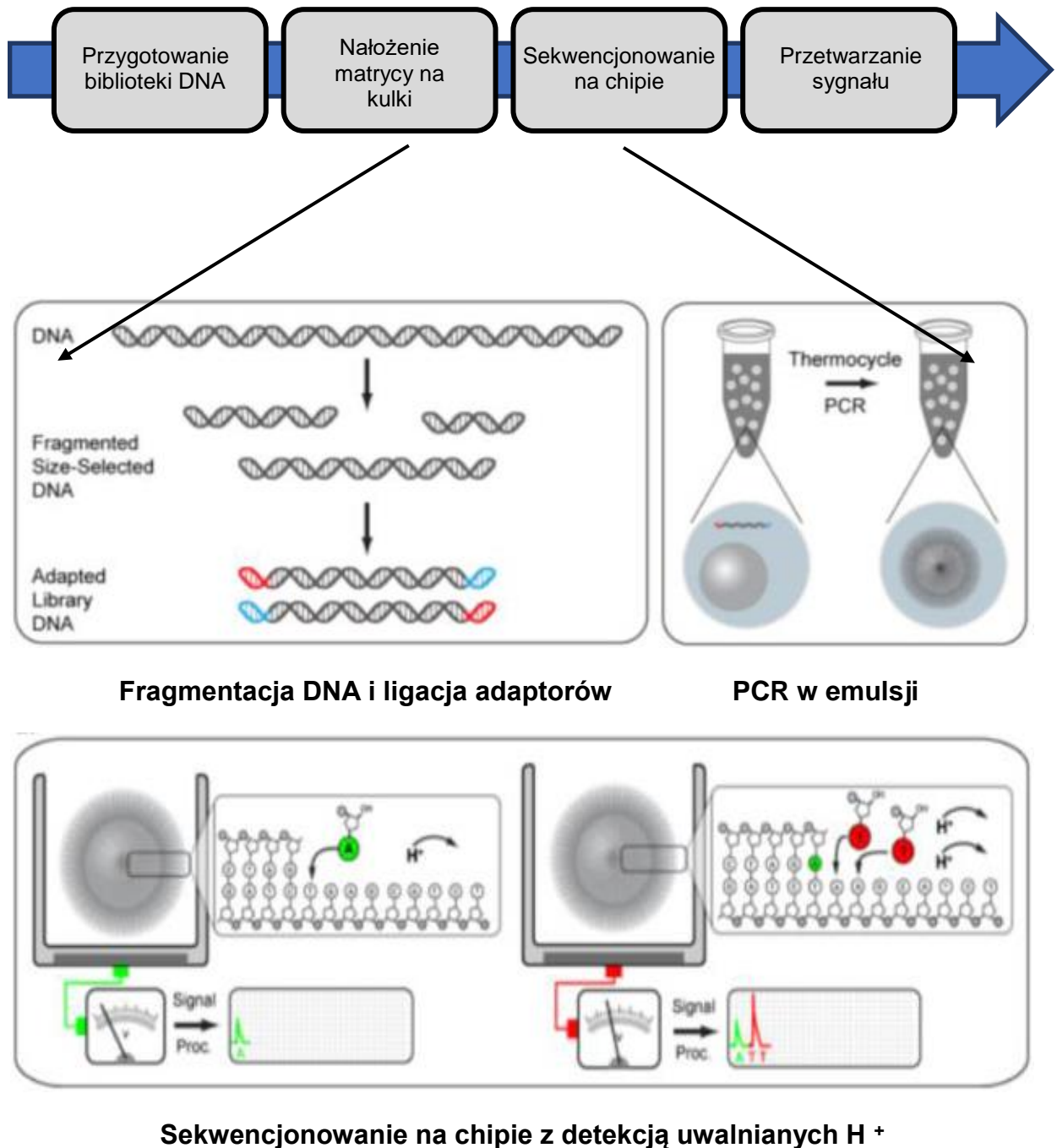
Ponownie wykonano rozdział elektroforetyczny w 2 % żelu agarozowym, z którego wyizolowano produkt o wielkości ~200 pz i oczyszczono na kolumnach (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Bionovo) uzyskując materiał gotowy do analizy.

Sekwencjonowanie fragmentów CDR3 wybranych hybrydom wykonano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN w Warszawie. Otrzymane sekwencje nukleotydowe, po przepisaniu na sekwencje aminokwasowe, wykorzystano do analizy.

3.10. Sekwencjonowanie na platformie Ion Torrent

Sekwencjonowanie DNA metodą Ion Torrent zaliczamy do „wysokoprzepustowych” analiz nowej generacji (NSG). Jest to technologia oparta o sekwencjonowanie przez syntezę z detekcją protonów na układzie scalonym, przy użyciu platformy Ion Torrent PGM (firmy Life Technologies). Do tego celu wykorzystano 2 chipy o wielkości 316 (6.3M). Obejmuje ona kolejno wymienione etapy (Ryc. 13). Maszyna jest zaprogramowana do pomiaru zmian kwasowości/ alkaliczności w jednostce czasu spowodowanej działaniem polimerazy na nukleotydy. IonTorrent zamiast fluorescencji odczytuje zmiany pH. Każdy dołek fazy stacjonarnej to mini-pHmetr, który odnotowuje lokalne zmiany pH, powstające podczas emisji protonu z przyłączanego nukleotydu. W porównaniu do innych metod brak znakowanych nukleotydów. Podczas sekwencjonowania Ion Torrent następuje dołączenie nukleotydu do łańcucha DNA za pomocą polimerazy. Produktem ubocznym tej reakcji jest wydzielający się jon wodoru oraz zmiana pH. Dołączanie przepuszczanych przez maszynę w znanej kolejności nukleotydów następuje sekwencyjnie. Zmiana pH powoduje uaktywnienie sensora umieszczonego na chipie. Jeśli podczas reakcji przyłączy się więcej niż jeden nukleotyd następuje większa

zmiana pH, co odczytywane jest przez sensor. Cały proces sekwencjonowania odbywa się bezpośrednio na chipie zaopatrzonym w miliony dołków, gdzie jednocześnie zachodzą reakcje. Każda odbywa się w indywidualnym dołku dzięki zastosowaniu emulsyjnej reakcji PCR, która umożliwiła rozdzielenie pojedynczych kopii DNA do poszczególnych dołków.



Ryc. 13. Schemat poglądowy technologii sekwencjonowania na platformie Ion Torrent (http://www.genomics.cn/en/navigation/show_navigation?nid=2640).

3.11. Analiza statystyczna wyników

W wyniku sekwencjonowania na platformie Ion Torrent uzyskano ok. 5 mln sekwencji fragmentów CDR3 receptorów TCR z wyizolowanych subpopulacji limfocytów T. Dane te pochodziły z 2 niezależnie przesłanych próbek do firmy Edge BioSystem. W celu zapewnienia odpowiednich narzędzi analitycznych zlecono firmie zewnętrznej napisanie specjalistycznych narzędzi informatycznych. Były to programy DNA seq i DNA baza.

Uzyskane sekwencje rozseparowano i pogrupowano względem sortowanych populacji. W celu określenia statystycznych różnic pomiędzy repertuarami receptorów TCR myszy nie leczonych, leczonych oraz kontrolnych wykorzystano test t-studenta dla prób niezależnych. Wyniki przedstawiano jako wartości średnie \pm SE. Poziom istotności statystycznej ustalono na poziomie $\alpha = 0,05$. Z kolei skalę podobieństwa pomiędzy badanymi próbkami oznaczono za pomocą wskaźnika Morisita-Horn, w którym porównano nakładanie się sekwencji bazując na ich częstości występowania w każdej populacji. Do obliczenia wskaźnika wykorzystywano podobną liczbę sekwencji CDR3 z porównywanych populacji.

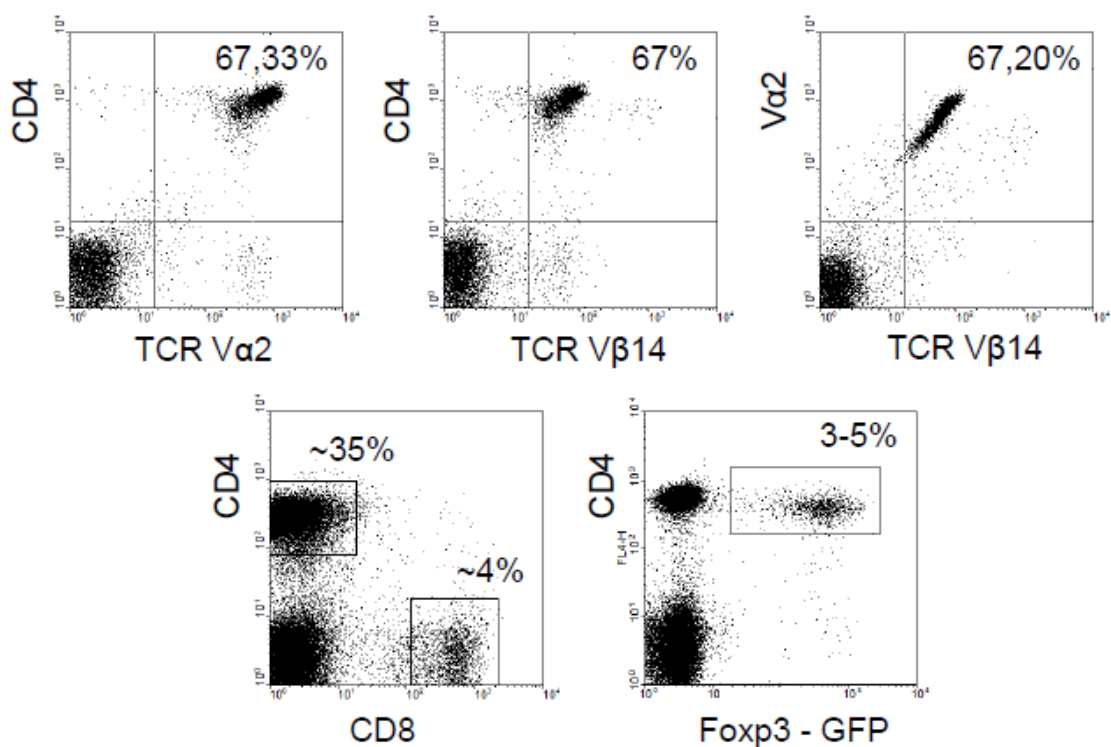
Kolejnym parametrem podlegającym ocenie pomiędzy badanymi repertuarami TCR była analiza różnorodności. Określa ona stopień niepewności w znalezieniu danej jednostki w ciągu badanych jednostek i bierze pod uwagę liczbę różnych jednostek jak również częstość ich występowania. Współczynnik Pearsona (P_c) został obliczony dla zestawów częstotliwości TCR przy użyciu oprogramowania Microsoft Excel. Z kolei różnorodność repertuaru receptorów obliczono przy użyciu metody opisanej przez Chao i współpracowników [Chao et al. 2006].

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} oraz czerniaka B16 A^bEp63K

Repertuar receptorów (TCR) charakteryzuje się ogromną różnorodnością. Stworzenie myszy transgenicznych o zawężonym repertuarze TCR $\alpha\beta$ pozwala

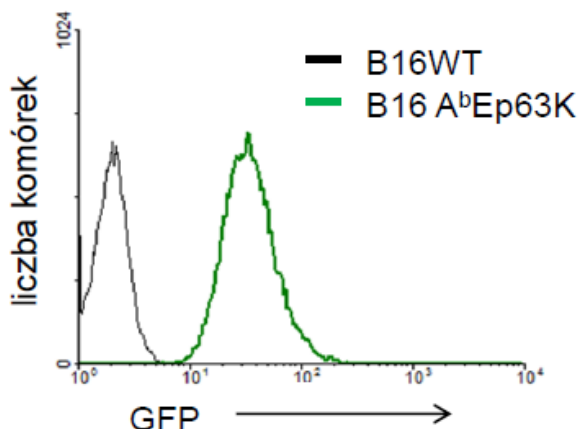
na ograniczenie jego do tzw. „mini repertuaru”. Badania oparto na unikalnym modelu myszy $\text{TCR}^{\text{miniFoxp3GFP}}$, w którym wszystkie komórki T mają ten sam transgeniczny łańcuch TCR β , a łańcuch α podlega naturalnej rearanzacji z wykorzystaniem tylko jednego segmentu $V\alpha$ i dwóch segmentów $J\alpha$. Różnorodność receptorów ogranicza się do fragmentu CDR3 TCR α , co umożliwia monitorowanie zmian w ich repertuarze na poziomie pojedynczych, funkcjonalnie odrębnych klonów. Dzięki temu modelowi możliwa była charakterystyka receptorów na różnych sub-populacjach limfocytów T, zaangażowanych w odpowiedź przeciwnowotworową. Dodatkowo, myszy $\text{TCR}^{\text{miniFoxP3GFP}}$ posiadają genetyczny znacznik limfocytów T reg (FoxP3^+) w postaci ekspresji zielonego białka fluorescencyjnego (GFP). Repertuar TCR myszy TCR^{mini} zawiera liczne receptory, specyficzne dla $\text{A}^b\text{Ep63K}$, ponieważ TCR, który użyto jako szablon do wytworzenia konstrukt TCR^{mini} został sklonowany z komórki T CD4^+ specyficznej dla tego antygeny (Kuczma et al. 2010) (Ryc. 14).



Ryc. 14. Ekspresja transgenicznego receptora TCR na komórkach CD4^+ węzłów chłonnych myszy $\text{TCR}^{\text{miniFoxp3GFP}}$ (**górny panel**) oraz fenotyp $\text{CD4}/\text{CD8}$ i $\text{CD4}/\text{Foxp3}$ węzłów chłonnych (**dolny panel**).

Jako modelowy nowotwór wykorzystano myszą linię czerniaka B16, z ekspresją neo-antygeny (peptyd Ep63K) prezentowanego w kontekście MHC klasy II- A^b

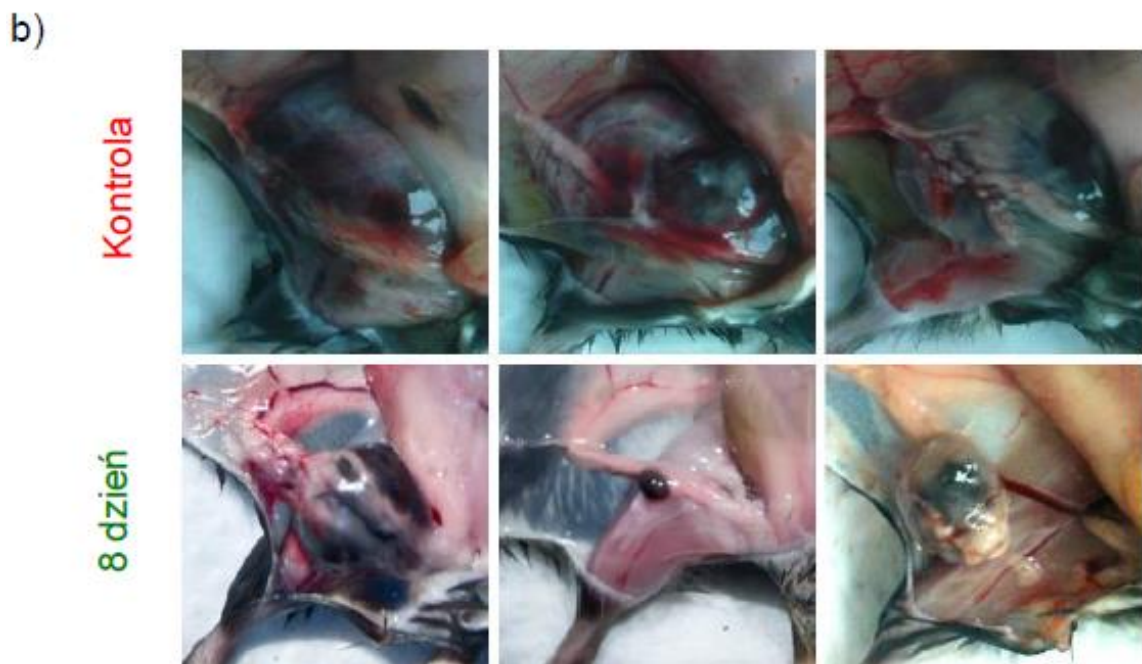
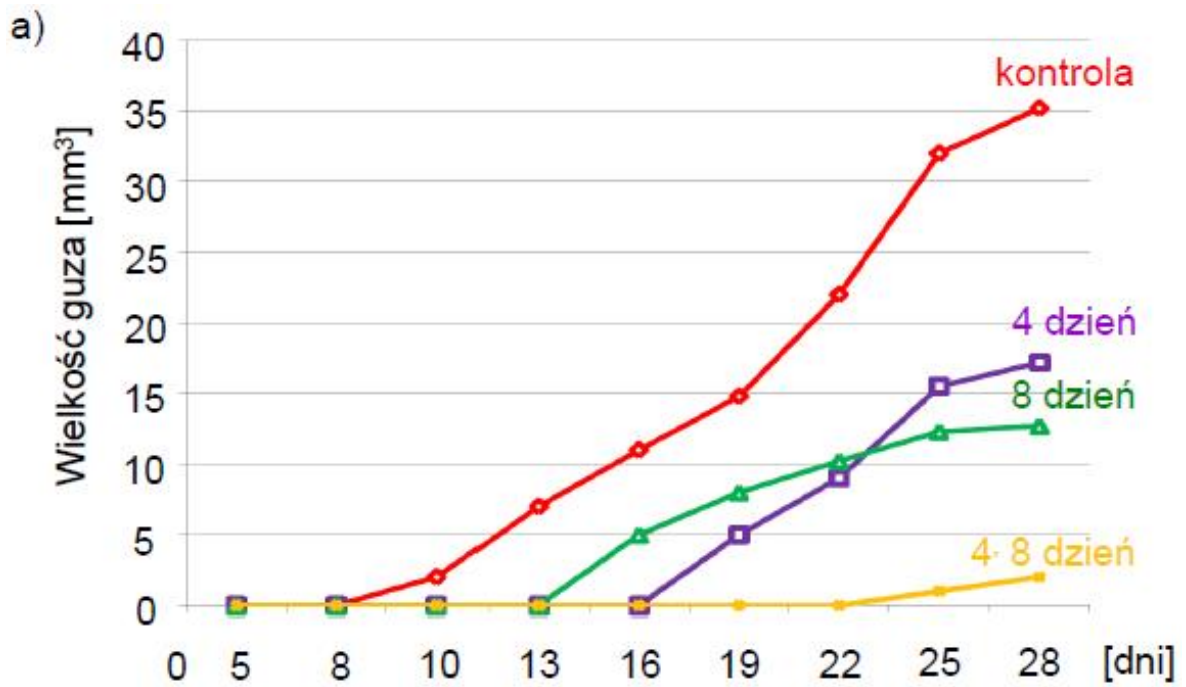
(Ryc. 15). We wcześniejszych eksperymentach wykazano, że tak zmodyfikowana linia czerniaka po podskórnym wszczepieniu komórek myszom TCR^{mini}FoxP3^{GFP} aktywuje co najmniej 20 różnych receptorów TCR komórek T CD4⁺ ef (dane niepublikowane).



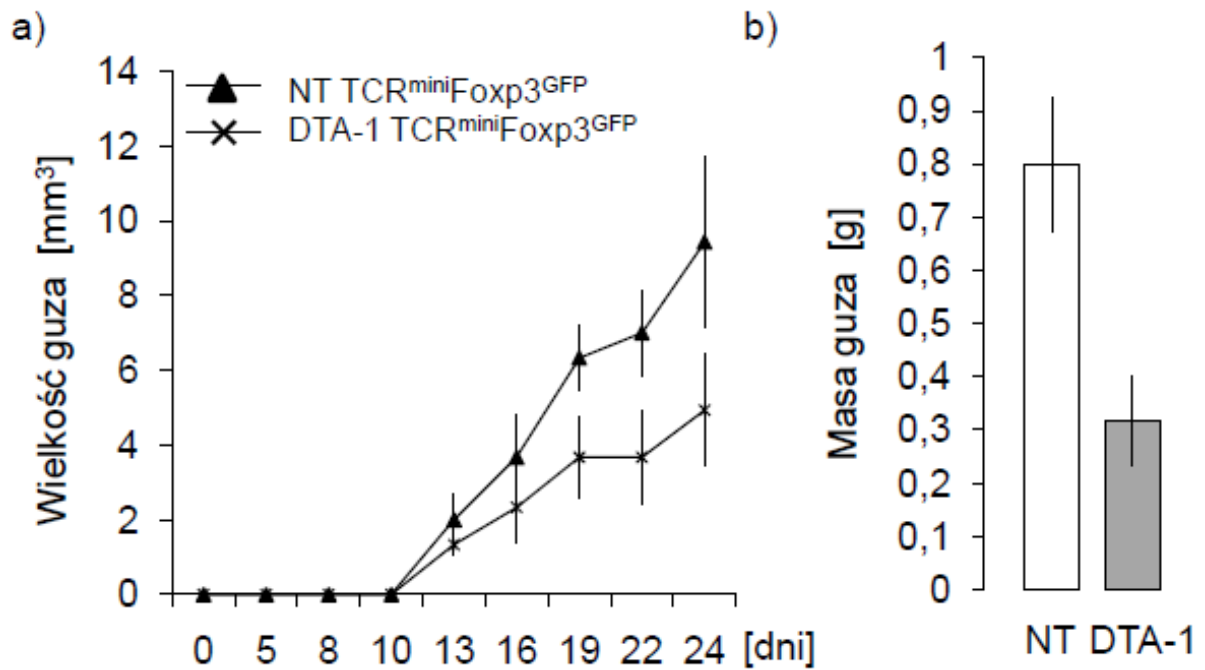
Ryc. 15. Ekspresja antygenu A^bEp63K na modyfikowanych komórkach czerniaka B16.

4.2. Wpływ przeciwciała DTA-1 na zahamowanie wzrostu guza nowotworowego

Immunoterapia monoklonalnym przeciwciałem anty-GITR (DTA-1) wpływa na zahamowanie wzrostu czerniaka B16 zarówno u myszy WT^{GFP} (Ryc. 16), na których optymalizowano protokół, jak również u myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} (Ryc. 17), właściwym modelu eksperymentalnym. Wyniki potwierdzają skuteczność działania terapii. Panel 16 a) przedstawia kinetykę wzrostu guza u myszy typu dzikiego, w zależności od dnia podania przeciwciała DTA-1, jak i liczby dawek. Już jednokrotne podanie DTA-1 powoduje zahamowanie wzrostu nowotworu. Optymalizacja zastosowanej terapii w niniejszej pracy, nie miała na celu całkowitego wyleczenia, a jedynie spowodować zahamowanie wzrostu guza (wywołanie efektu terapeutycznego). Zabieg ten był związany z potrzebą wykonania eksperymentów na komórkach naciekających na guz. Panel 16 b) przedstawia zdjęcia guzów z grupy kontrolnej oraz grupy, w której DTA-1 podano dnia 8 (najbardziej satysfakcjonujący protokół dla dalszych eksperymentów). Sytuacją wartą odnotowania jest fakt, że zbyt późne podanie DTA-1 (16 dni po wstrzyknięciu komórek czerniaka) nie wywołuje efektu terapeutycznego, rozwój nowotworu przebiega podobnie jak w przypadku myszy nie leczonych (obserwacje własne).



Ryc. 16. Opracowanie protokołu immunoterapii czerniaka B16 A^bEp63K przeciwciałem DTA-1 na myszach WT^{GFP}. W eksperymencie wykorzystano 4 gr. myszy (n=3), którym wstrzyknięto 5×10^3 B16 A^bEp63K s.c. Podanie DTA-1 (1mg/mysz i.p.) odbywało się 4, 8 lub 4 i 8 dnia. Myszy kontrolne otrzymały szczurzą immunoglobulinę kontrolną o tym samym izotypie co DTA-1. Wzrost guza monitorowano co ~ 3 dni, a pomiar wielkości odbywał się za pomocą suwmiarki. Eksperyment powtórzono 2 krotnie.

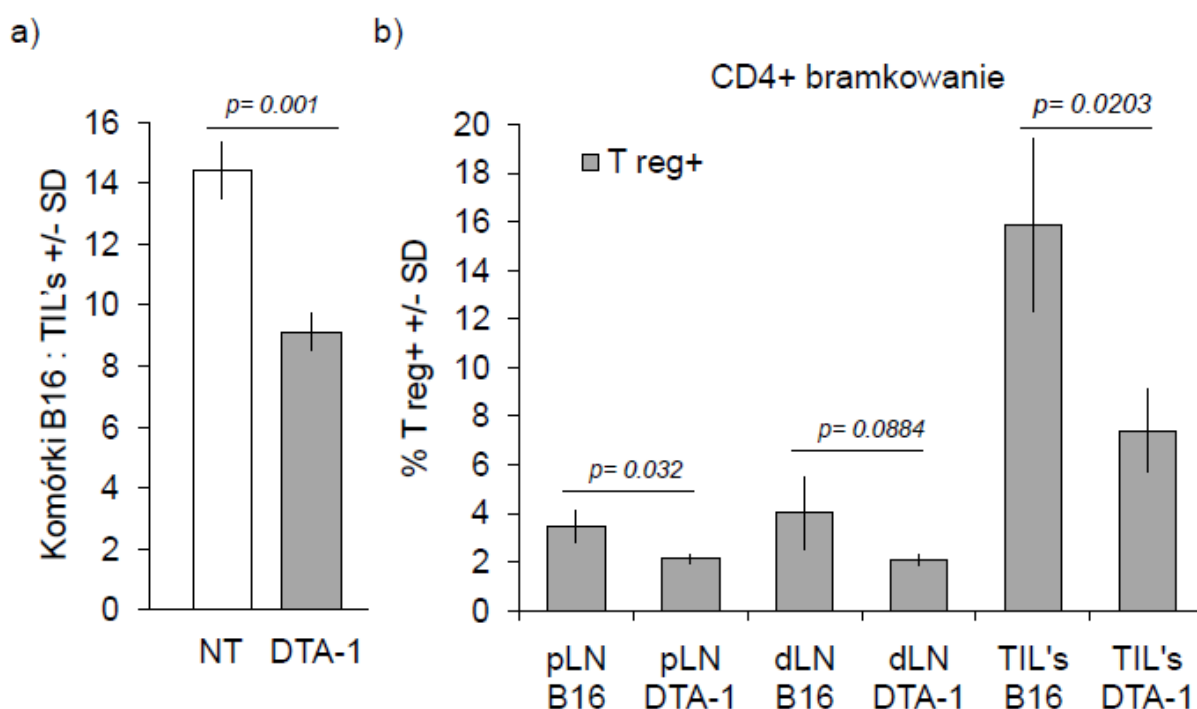


Ryc. 17. Wpływ immunoterapii przeciwciałem DTA-1 u myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} obciążonej nowotworem B16 A^pEp63K. Osiem dni po podskórnym wstrzyknięciu komórek czerniaka (5×10^3 komórek) podawano pojedynczą dawkę DTA-1 i.p. (1 mg/mysz). Kinetyka wzrostu guza u myszy traktowanych DTA-1 i nietraktowanych (NT), które otrzymały szczurzą immunoglobulinę: wykres wielkości guza (**a**) i wykres masy guza z +/- SD, $p:0.0001$ (**b**). Wielkość guza, jego masa w 24 dni po iniekcji uległy zmniejszeniu o 50-60% u myszy traktowanych DTA-1 w porównaniu do myszy kontrolnych.

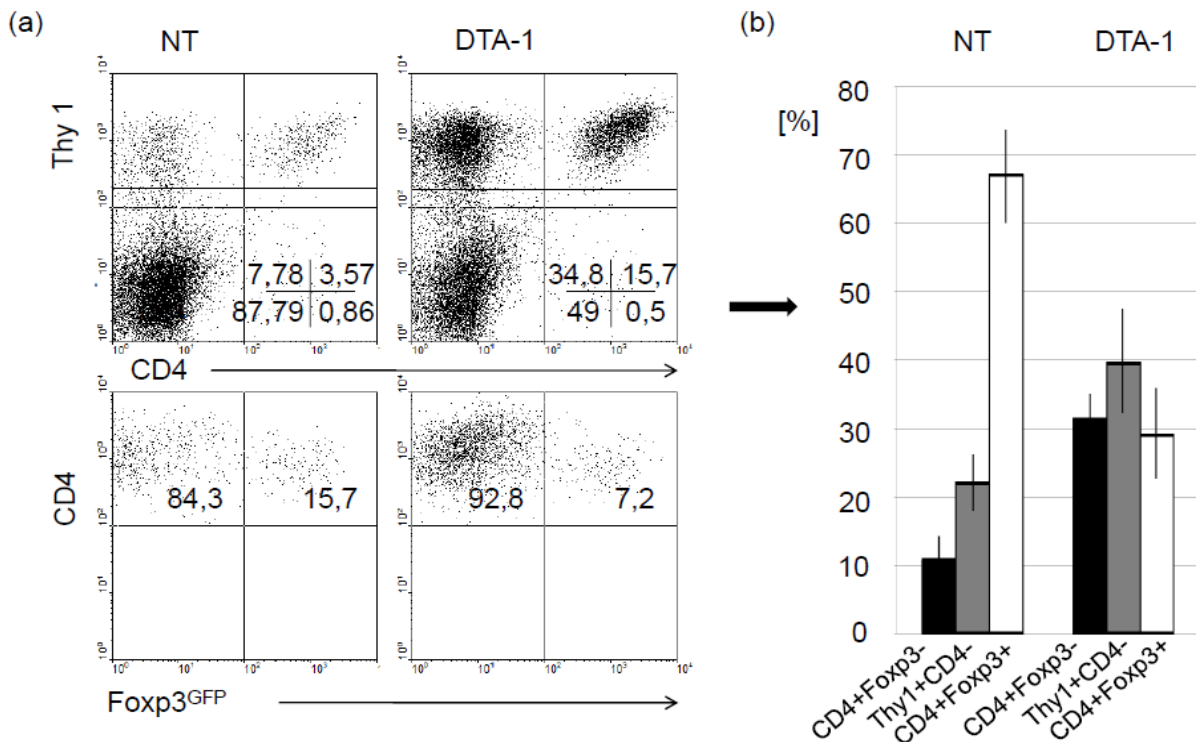
4.3. Proporcje, fenotyp i poziom aktywacji limfocytów T ef i T reg w czasie odpowiedzi przeciwnowotworowej

W celu ustalenia zmian ilościowych i jakościowych w populacjach limfocytów T podczas rozwoju choroby u myszy nieleczonych jak i u myszy poddanych immunoterapii wykonano szereg analiz cytometrycznych określających poziom ekspresji receptorów CD4⁺, CD8⁺, Thy-1⁺, CD62L (marker aktywacji), GITR, w takich lokalizacjach jak: pLN, dLN, guz. W obrębie guza wyróżniono tzw. tumor infiltrating lymphocytes (TIL), rozdzielone na populacje efektorowe i regulatorowe.

Podczas wykonywania eksperymentów zaobserwowano, że wraz z zahamowaniem wzrostu guza następuje zwiększenie stosunku limfocytów infiltrujących guz do komórek nowotworowych B16 A^bEp63K. Z kolei odsetek komórek regulatorowych w obrębie populacji limfocytów infiltrujących guz i limfocytów T węzłów chłonnych zmniejsza się, a proporcja komórek T CD4⁺ efektorowych wzrasta (Ryc. 18 a,b) (Ryc. 19 a,b).

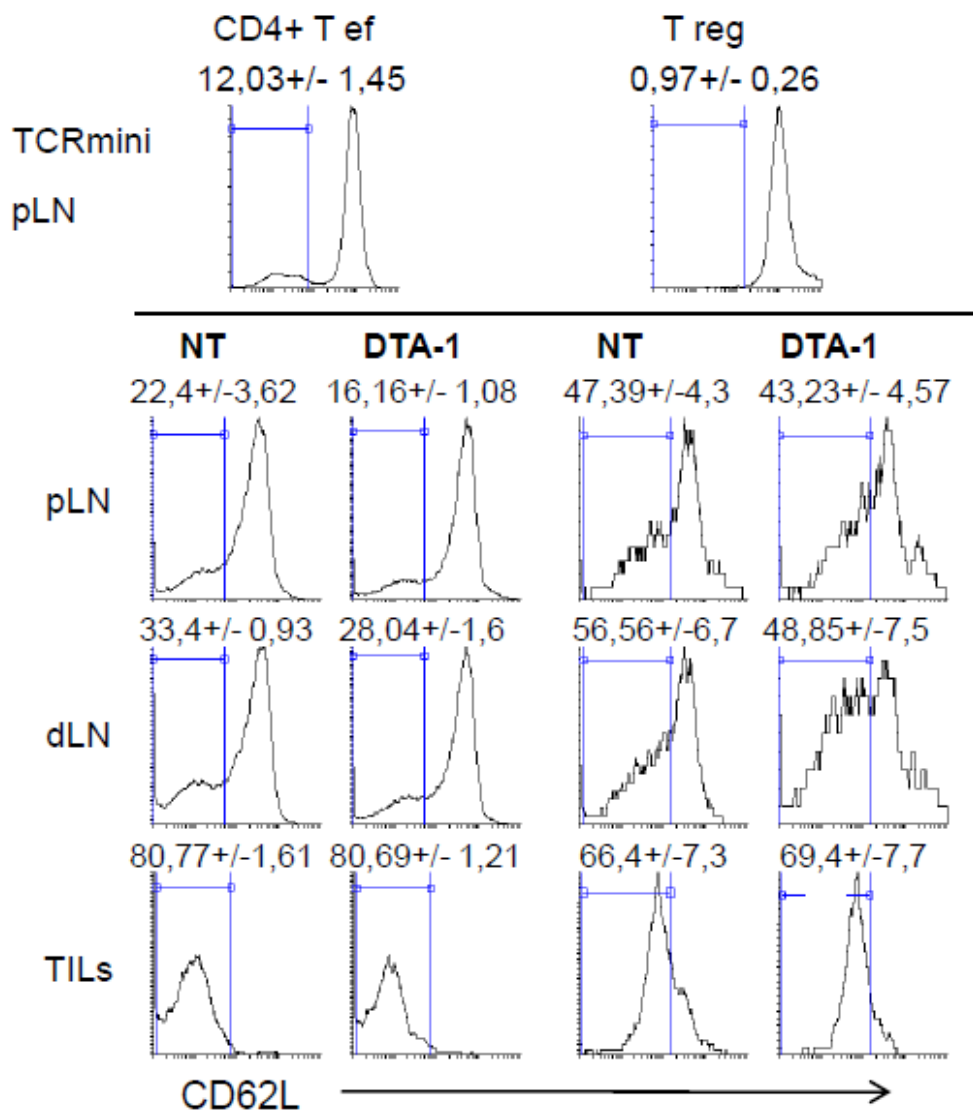


Ryc. 18. Stosunek limfocytów T infiltrujących nowotwór (TIL) do komórek czerniaka B16 A^bEp63K, *p*=0.001 **(a)** i procent T reg w całkowitej liczbie limfocytów T CD4⁺ obwodowych węzłów chłonnych (pLN), drenujących węzłów chłonnych (dLN) i TIL u myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} nietraktowanych i traktowanych DTA-1 **(b)**.

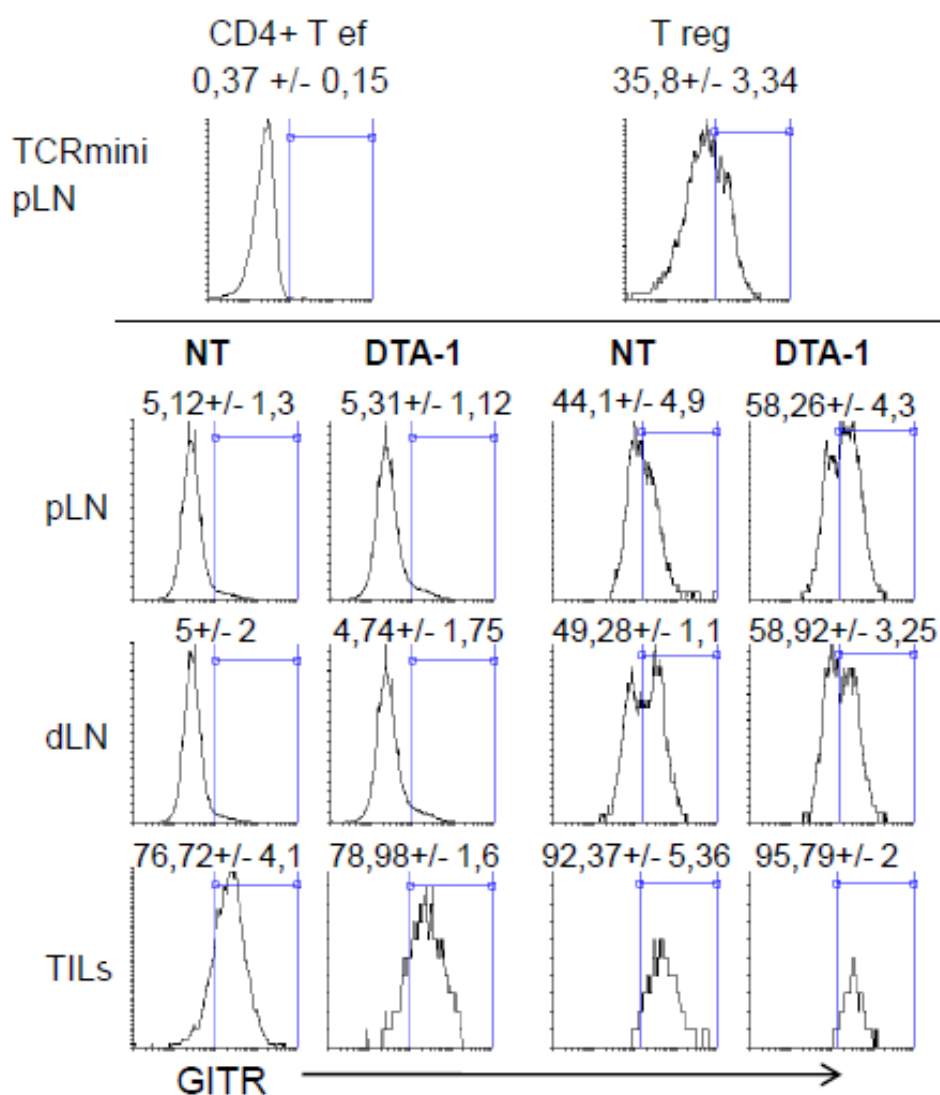


Ryc. 19. Analiza cytofluorometryczna proporcji limfocytów T efektorowych i regulatorowych w czasie odpowiedzi przeciwnowotworowej w środowisku guza u myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} (a, b)

Warto zauważyć, że większość komórek regulatorowych infiltrujących nowotwór oraz limfocytów T CD4⁺ efektorowych prezentują aktywowany (CD62L^{low}) fenotyp niezależnie od terapii DTA-1 oraz podwyższony poziom receptora GITR, sugerując, że repertuar receptorów TCR tych komórek ulega aktywacji (Ryc. 20, 21).



Ryc. 20. Analiza cytofluorymetryczna ekspresji receptora CD62L na populacji komórek T CD4⁺ efektorowych i CD4⁺ regulatorowych z obwodowych węzłów chłonnych (pLN), drenujących węzłów chłonnych (dLN) oraz populacji infiltrującej guz (TIL) u myszy nie leczonych, leczonych i kontrolnych. Histogramy wygenerowano na podstawie analizy programu i przedstawiają procent pozytywnych komórek, po uprzednim bramkowaniu.



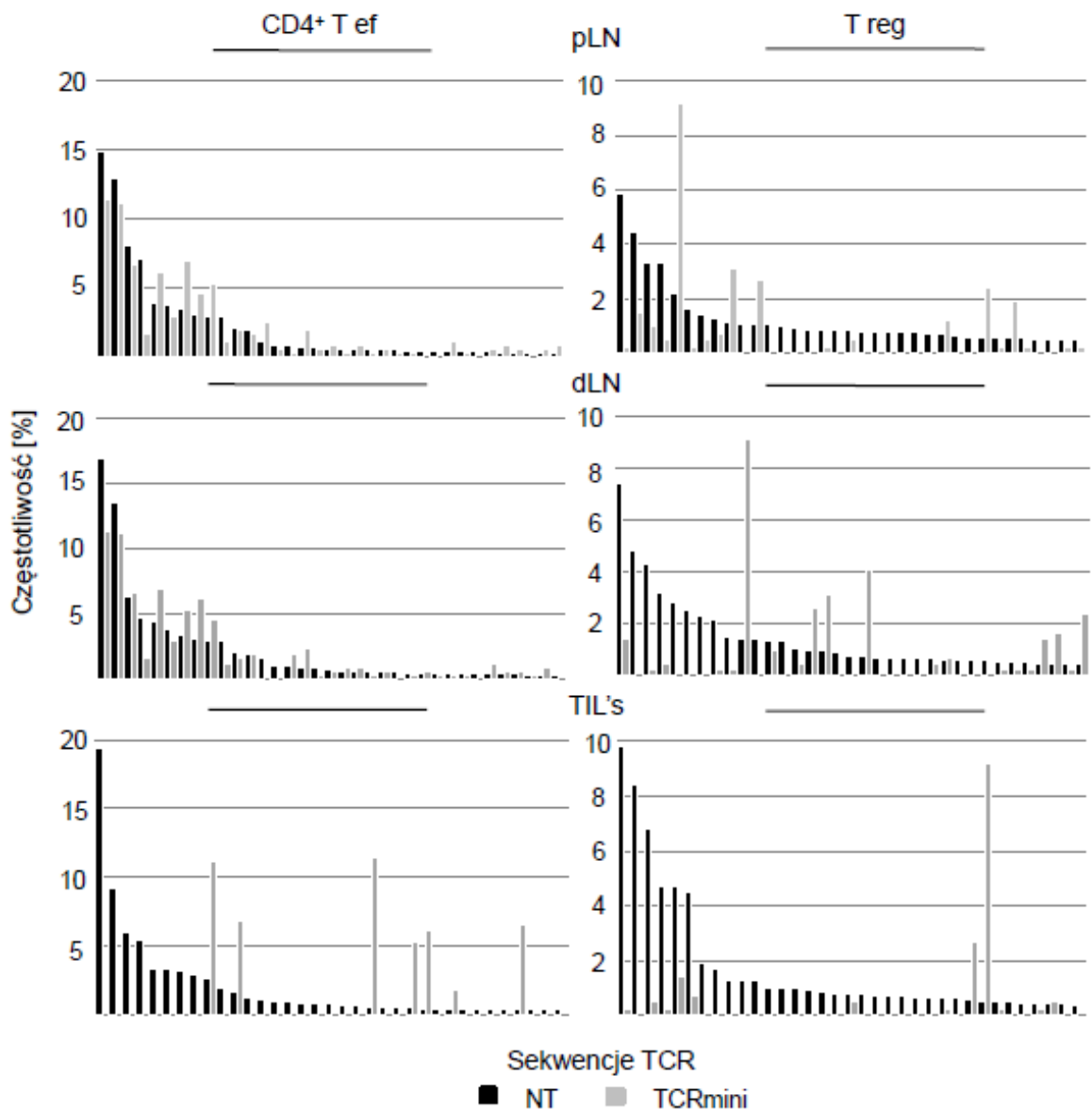
Ryc. 21. Analiza cytofluometryczna ekspresji receptora GITR na populacji komórek T CD4⁺ efektorowych i CD4⁺ regulatorowych z obwodowych węzłów chłonnych (pLN), drenujących węzłów chłonnych (dLN) oraz populacji infiltrującej guz (TIL) u myszy nie leczonych, leczonych i kontrolnych. Histogramy wygenerowano na podstawie analizy programu i przedstawiają procent pozytywnych komórek, po uprzednim bramkowaniu.

4.4. Wpływ nowotworu na repertuar receptorów TCR komórek CD4⁺ T efektorowych i regulatorowych

W celu oceny stopnia przesunięcia repertuaru TCR w kierunku antygenów nowotworowych, w różnych narządach myszy obciążonych nowotworem oraz oszacowania udziału publicznych klonów w odpowiedzi przeciwnowotworowej, porównano częstotliwość dominujących receptorów TCR komórek T CD4⁺ z ich częstotliwością u normalnych, zdrowych myszy TCR^{mini}. Opracowano częstotliwość 35 najczęstszych TCR ekspresjonowanych przez limfocyty CD4⁺ T efektorowe i regulatorowe, wyizolowane z węzłów chłonnych lub infiltrujące guz B16 A^bEp63K, w zestawieniu do ich częstotliwości w repertuarze TCR zdrowych myszy. Wyniki pokazane na rycinie 25 wskazują, że zarówno w pLN jak i dLN większość dominujących klonów TCR CD4⁺ u myszy obciążonych nowotworem, znaleziono z podobną częstotliwością w repertuarze TCR myszy zdrowych. Z drugiej strony tylko około 20% TCR stwierdzonych jako 35 dominujących T efektorowych CD4⁺ klonów w naciekach nowotworowych, znaleziono wśród limfocytów krążących w grupie myszy zdrowych, choć z inną częstotliwością.

W przeciwieństwie do komórek efektorowych proporcja i częstotliwość klonów T regulatorowych, dzielących te same TCR, były bardzo różne, nie tylko w obrębie guza, ale i w dLN i pLN, gdzie różnice są najbardziej wyraźne. W związku z tym doszliśmy do wniosku, że w węzłach chłonnych dochodzi do znacznie silniejszej przebudowy repertuaru TCR komórek regulatorowych niż efektorowych.

W środowisku nowotworu limfocyty infiltrujące guz, zarówno regulatorowe jak i efektorowe miały repertuar TCR podobnie zmieniony, głównie z powodu ekspansji klonalnej niskiej częstotliwości lub nowych klonów (Ryc. 22).

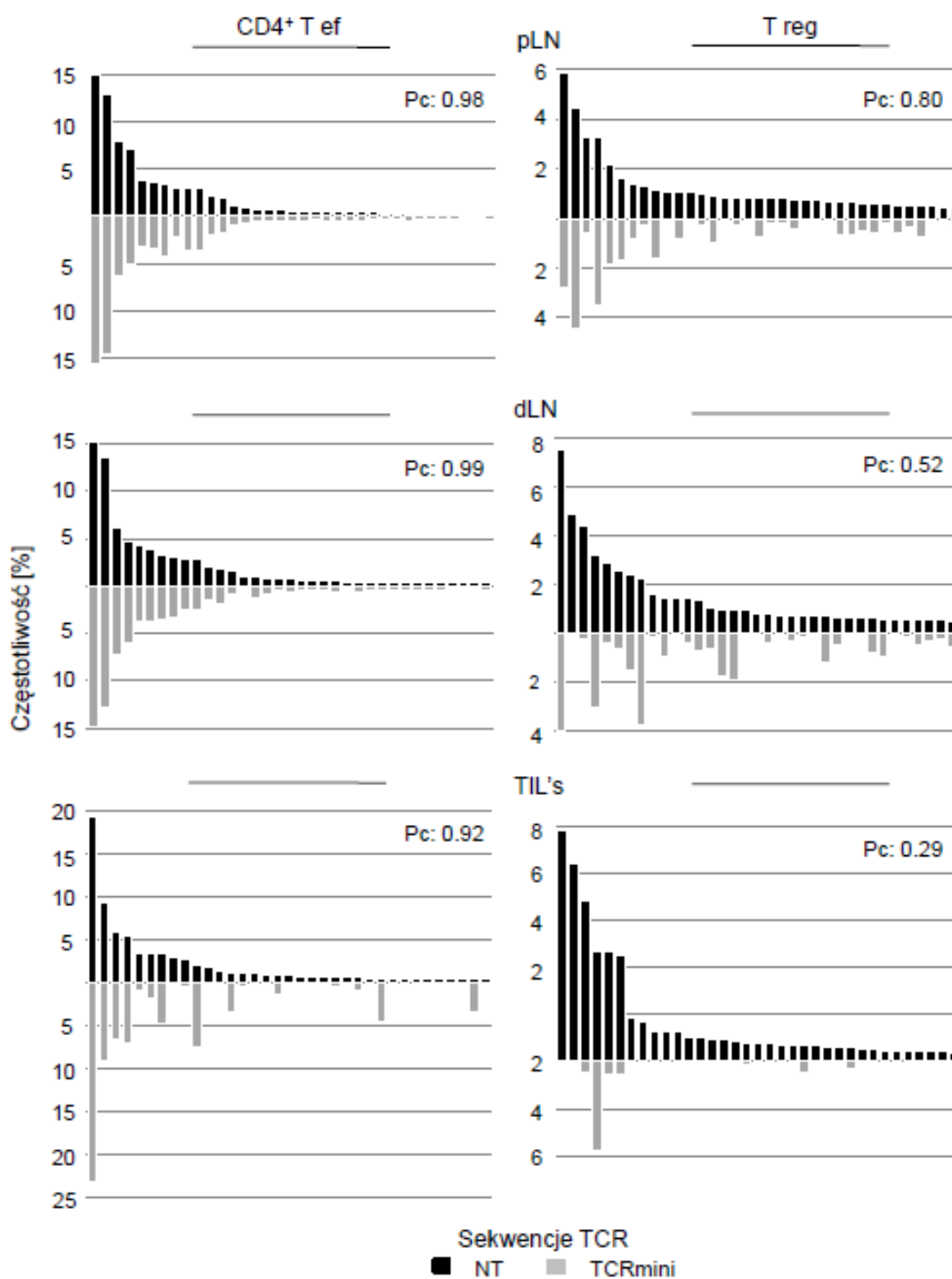


Ryc. 22. Porównanie dominujących receptorów TCR ekspresjonowanych przez komórki T CD4⁺ efektorowe i regulatorowe u zdrowych i obciążonych nowotworem myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP}. Wpływ guza na repertuar TCR komórek CD4⁺ T ef i T reg. Częstotliwość 35 najbardziej dominujących TCR z komórek T efektorowych CD4⁺ i T reg ze wskazanych miejsc występowania nowotworu B16-A^bEp63K (czarne słupki) myszy w porównaniu do TCR obecnych w limfocytach krążących u zdrowych myszy kontrolnych, bez nowotworów (szare słupki).

4.5. Wpływ traktowania DTA-1 u myszy obarczone nowotworem w repertuarze TCR CD4⁺ T ef i T reg

Wykazano, że działanie DTA-1 na myszy obarczone nowotworem powoduje zmianę składu populacji T reg poprzez deplecję aktywowanych T reg (GITR^{hi}) i promowanie ekspansji naiwnych komórek regulatorowych [Kim et al. 2015].

Aby przeanalizować wpływ leczenia DTA-1 na klonalną różnorodność komórek CD4⁺ T ef i T reg w nowotworach myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} porównano częstotliwości 35 najczęstszych klonów w pLN, dLN i guzie z myszy nieleczonych i traktowanych DTA-1. Rycina 26 pokazuje, że w węzłach chłonnych leczenie DTA-1 zmieniało głównie częstotliwości klonów T reg, natomiast częstotliwości dominujące klonów komórek CD4⁺ T ef pozostały prawie niezmienione. Terapia przeciwciałem DTA-1 spowodowała zmianę częstotliwości w naciekach nowotworowych wielu dominujących klonów T reg i CD4⁺ T ef. Zwłaszcza znaczącą zmianę zaobserwowano w populacji komórek regulatorowych. Większość (80%) analizowanych klonów T reg naciekających na guzy myszy nieleczonych nie pokryło się z repertuarem komórek T reg wyizolowanych z nowotworów myszy potraktowanych DTA-1. Pozostałe klony miały niską częstotliwość. Warto zauważyć, że częstotliwości 7 (20%) klonów CD4⁺ T ef u myszy nieleczonych znacznie się zwiększyły po leczeniu DTA-1, podczas gdy nie było takich klonów wykrytych w populacji T reg naciekających guz. Wartości współczynników Pearsona (Pc) (odzwierciedlają stopień podobieństwa między dwoma zestawami sekwencji TCR) dla komórek CD4⁺ T ef z pLN, dLN były wysokie. Wyjątek stanowiły po terapii DTA-1, naciekające guzy TIL. Były to liczne klony komórek, na bardzo niskim poziomie występowania. Wartości Pc T reg w obrębie guza myszy leczonych były znacznie niższe, co wskazywało na to, że terapia DTA-1 znacząco zmieniła częstotliwości klonowania w obrębie tej populacji (Ryc. 23).



Ryc. 23. Wpływ leczenia DTA-1 na repertuar receptorów TCR komórek CD4⁺ T ef i T reg w pLN, dLN, guzach myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} obarczonych nowotworem. Czarne i szare paski odpowiadają odpowiednio myszom nietraktowanym i traktowanym przeciwciałem DTA-1. Współczynnik Pearsona (Pc) podano powyżej każdego wykresu.

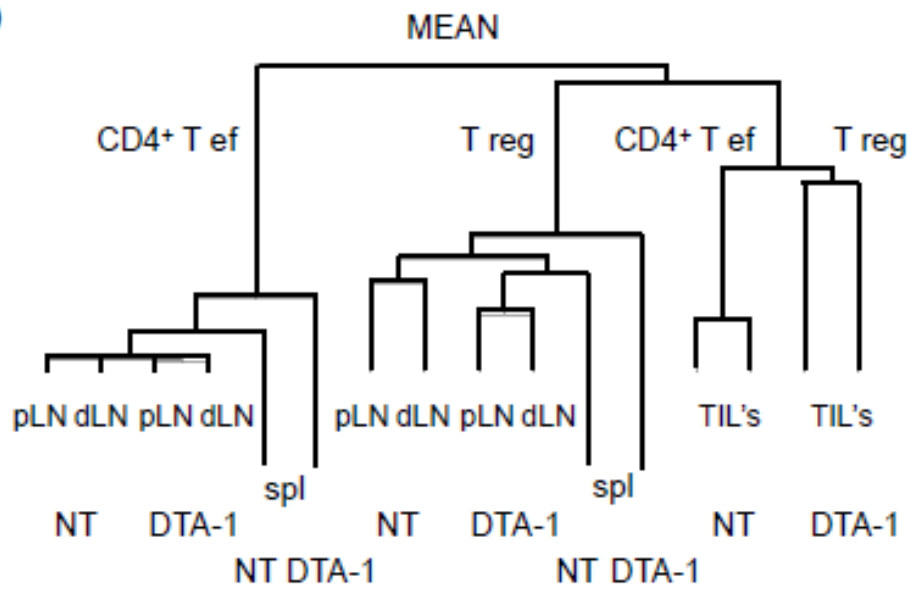
Analiza złożoności repertuaru TCR myszy poddanych leczeniu i nieleczonych polegała na porównaniu TCR i określeniu odsetka wspólnych receptorów TCR dla populacji komórek CD4⁺ T ef i T reg z węzłów limfatycznych i infiltrujących nowotwór (Ryc. 24). Utworzenie hierarchicznych klastrów, przedstawiających podobieństwo repertuaru TCR, wskazało na bliskie sąsiedztwo populacji komórek CD4⁺ T ef i T reg TIL. Z kolei dalekie podobieństwo znaleziono wśród populacji limfocytów CD4⁺ T ef i T reg pochodzących z różnych narządów limfatycznych, w tym dLN. Dlatego zostały umieszczone w oddzielnych gałęziach (Ryc. 24a), sugerując, że większość CD4⁺ TIL ekspresjonuje rzadkie receptory TCR.

W celu porównania różnorodności repertuaru TCR wykorzystano krzywe akumulacji frekwencji receptorów. To narzędzie statystyczne przedstawia liczbę różnych receptorów TCR tworzących cały repertuar TCR danej populacji. Im szybciej krzywa osiąga 100%, tym bardziej zubożony w unikalne TCR jest w populacji repertuar, tym mniej jest różnorodny. Określono krzywe akumulacji dla populacji. Ocena globalnej złożoności TCR wykazała, że Leczenie DTA-1 w przypadku dLN zwiększyło ogólną różnorodność zarówno T reg jak i CD4⁺ T ef. Jednakże, tylko w guzie różnorodność komórek T reg - głównie tych o niskiej częstości wzrosła, a różnorodność limfocytów T ef zmniejszyła się (Ryc. 24b). Może to wskazywać na:

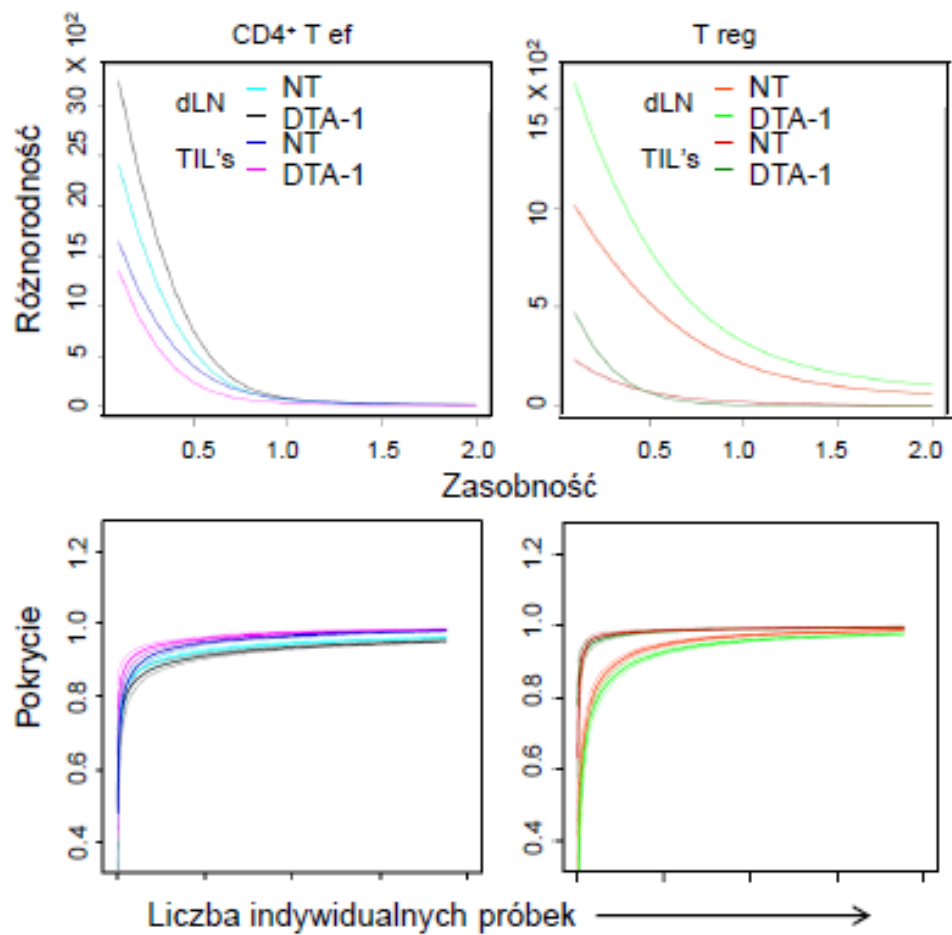
- ablację dominujących klonów T reg w środowisku guza i ich zastąpienie przez rzadkie klony, pochodzenia grasiczego lub konwersję niektórych komórek CD4⁺ T ef,
- porównanie liczby różnych klonów pośród T ef i T reg zidentyfikowanych w ramach tej samej (2×10^4) liczby limfocytów infiltrujących guz u myszy nieleczonych i leczonych potwierdziło, że terapia DTA-1 zwiększyła różnorodność T reg w guzie, co daje większy odsetek wspólnych receptorów TCR (224 vs. 510) (Ryc. 24c). Wskaźniki podobieństwa między TIL T reg i dLN T reg z leczonych myszy są niskie, co również wskazuje, że (również w odniesieniu do analizy różnorodności) DTA-1 wyeliminowało lokalnie, wewnątrz guza, dominujące klony T reg, a nie wzmocniło rekrutację nowych komórek T reg z dLN. Prawdopodobnie klony T ef i T reg, które wyrażają identyczne TCR, rozpoznają te same antygeny, ale ich aktywacja może mieć inny wpływ na wzrost guza.

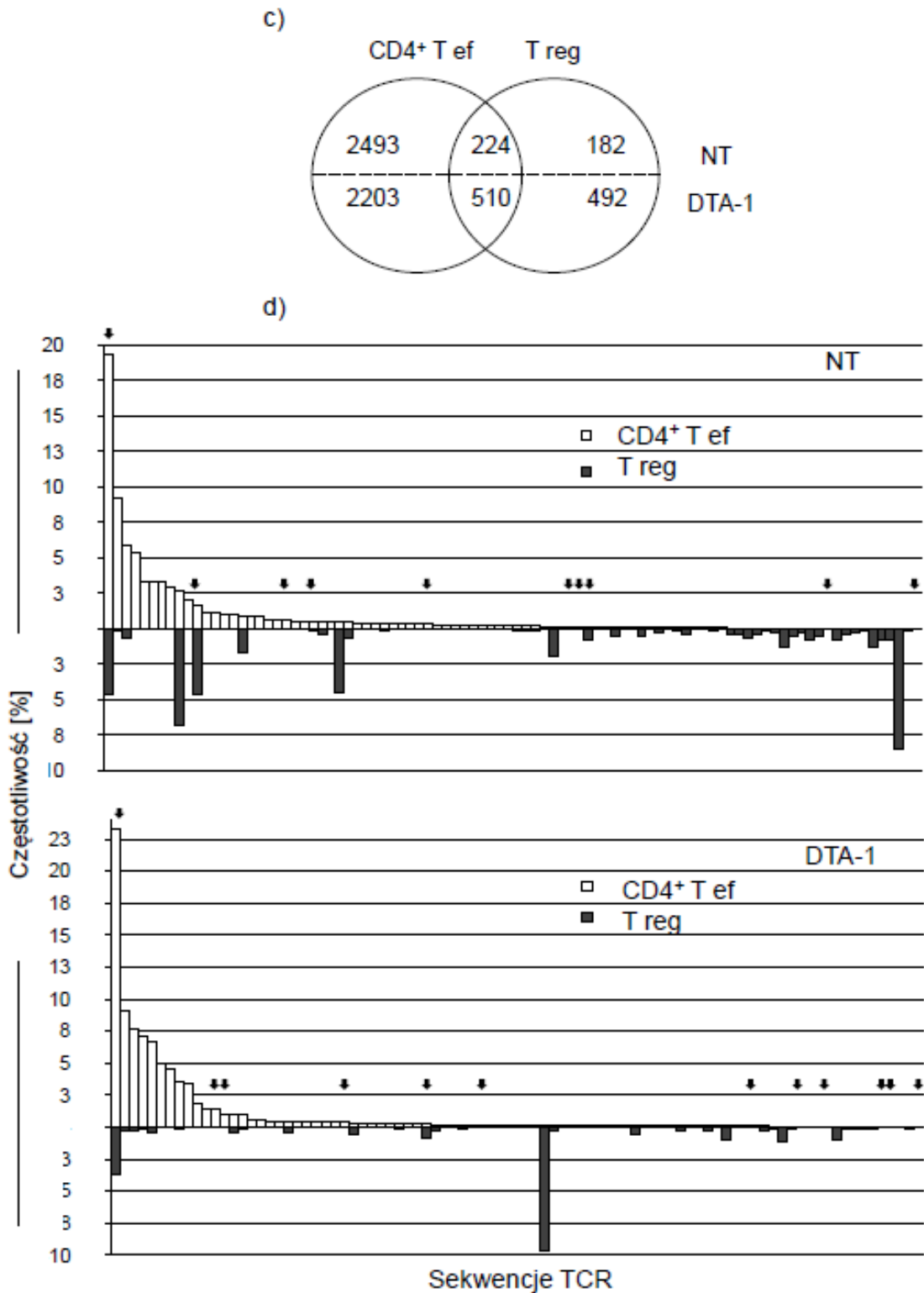
Aby uzyskać informację w kierunku zmian częstotliwości komórek CD4⁺ T ef i T reg TIL ekspresjonujących wspólne TCR, które mogą towarzyszyć regresji guza, przeanalizowano częstość takich klonów u myszy nieleczonych i traktowanych DTA-1. 100 receptorów TCR, które dominowały na CD4⁺ T ef TIL i były współdzielone z infiltrującymi guz komórkami T reg, oddzielnie od nieleczonych lub traktowanych DTA-1 myszy, oceniano pod względem częstości występowania odpowiadającym ich TCR. Wyniki pokazano na Ryc. 24d, wykazując, że po leczeniu DTA-1 częstotliwość klonów T reg, a szczególnie tych odpowiadającym najczęstszym klonom CD4⁺ T ef, spadła. Co więcej, TCR najczęściej występujących klonów CD4⁺ T ef, których częstotliwości były porównywalne lub wyższe wśród T reg, były nieobecne po leczeniu DTA-1. Ten wynik bezpośrednio sugerował, że DTA-1 wywiera przeciwny wpływ na populacje efektorowe i regulatorowe, współdzielące ten sam TCR o nieznanej reaktywności lub specyficznej reaktywności względem nowotworu (Ryc. 24d, strzałki).

a)



b)





Ryc. 24. Porównanie podobieństwa pomiędzy repertuarami receptorów TCR komórek T ef i klonów T reg z węzłów chłonnych (dLN i pLN), śledziony (spl) i nacieków nowotworowych (TIL) z nietraktowanych (NT) i traktowanych DTA-1 (DTA-1) u myszy $TCR^{mini}Foxp3^{GFP}$ (a). Różnorodność i pokrycie TCR z komórek CD4⁺ T ef i klonów T reg. Hierarchiczne wykresy przedstawiają krzywe akumulacji frekwencji receptorów TCR komórek, indeksy podobieństwa dla repertuaru TCR opartego

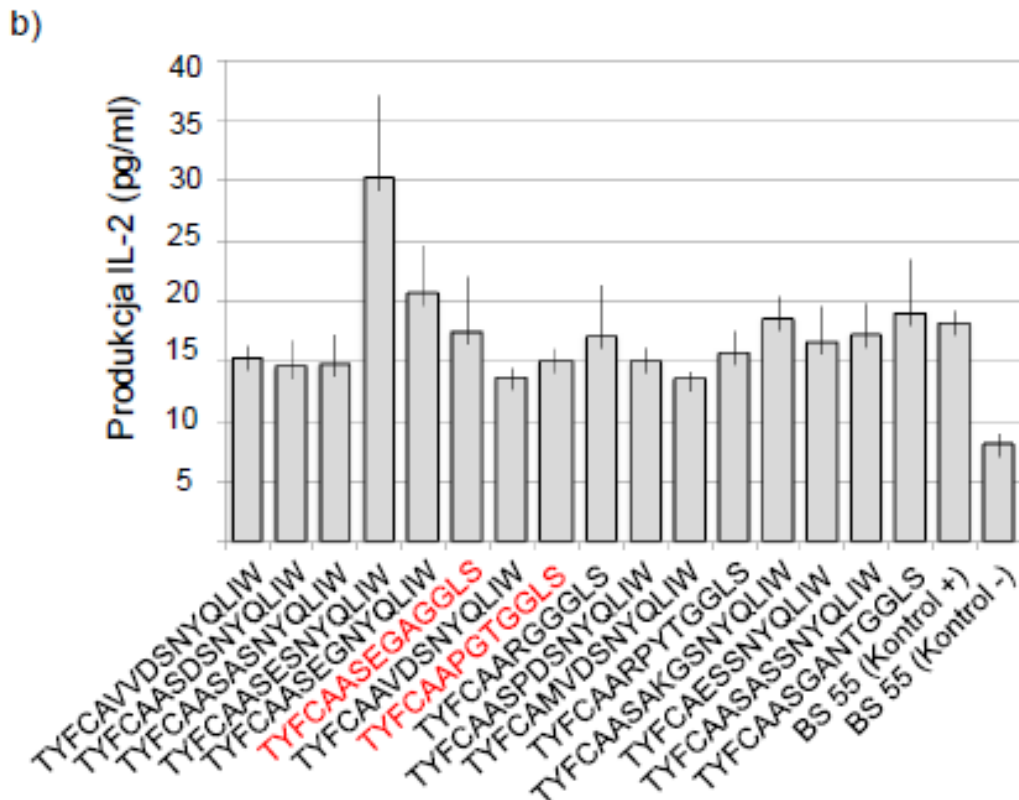
o sekwencjonowanie wysokiej przepustowości CDR3. Krzywa reprezentuje procentowy udział kolejnej unikalnej sekwencji TCR w repertuarze danej populacji. **(b)**. Wykresy kołowe (circle charts) pokazują liczby różnych TCR współdzielonych przez limfocyty CD4⁺ T_{ef} i T_{reg} lub ekspresjonowane tylko w każdym z tych podzbiorów osobno pośród 2 x 10⁴ TIL's z myszy nowotworowych NT lub traktowanych DTA-1 **(c)**. Częstotliwość 100 dominujących receptorów TCR dla CD4⁺ T_{ef} TIL's (open bars) i odpowiadającym im klonom T_{reg} TIL's (filled bars) z myszy NT (górny panel) i myszy traktowanych DTA-1 (dolny panel). Strzałki wskazują TCR znalezione również na hybrydomach komórek T pochodzących z tej samej puli komórek, które reagowały *ex vivo* na antygeny nowotworu B16 **(d)**.

4.6. Identyfikacja receptorów TCR specyficznych wobec czerniaka B16 A^bEp63K

W odpowiedzi na przeszczepiony nowotwór B16 A^bEp63K mysie komórki T CD4⁺ proliferują i jest to efektem zarówno specyficznych antygenów jak również namnażania się tzw. klonów biernie aktywowanych „bystander activated”. Są to wszędobylskie klony, ulegające aktywacji, obecne w środowisku, niezależnie od rodzaju stymulacji. W celu identyfikacji klonów swoistych wobec nowotworu, rozpoznających neo-antygen Ep63K lub natywne antygeny B16, wysortowano z guza, dLN komórki CD4⁺ efektorowe oraz regulatorowe z myszy nietraktowanych i traktowanych DTA-1 unieśmiertelniono je, otrzymując hybrydomy. Uzyskano 16 hybrydom specyficznych wobec czerniaka B16, w tym 2 okazały się być wyłącznie specyficzne dla neo-antygeny Ep63K (Ryc. 25). Pozostałe zareagowały na nieznanne, antygeny nowotworowe, wspólne dla czerniaków B16 i B16 A^bEp63K. Ich częstotliwość występowania u myszy nie leczonych i traktowanych DTA-1 porównano z repertuarem zdrowych myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP} (baza danych receptorów TCR pochodzących z modelu TCR^{mini}Foxp3^{GFP}). Odkryto, że wszystkie sekwencje TCR zidentyfikowane jako reaktywne wobec nowotworu były obecne w obu populacjach komórek efektorowych i regulatorowych, z różnymi częstotliwościami. Wydaje się, że komórki T_{ef} i T_{reg} ekspresjonujące TCR o tej samej swoistości mogą częściowo powstawać w wyniku konwersji limfocytów CD4⁺Foxp3⁻ lub tych, które były komórkami regulatorowymi, pochodzącymi z oddzielnych prekursorów lub wielu reaktywnych

a)

TCR	NFAT-GFP	
	B16	B16Ep63K
TYFCAASEGAGGLS	-	+
TYFCAAPGTGGLS	-	+
TYFCAASAKGSNYQLIW	+	+
TYFCAASEGNYQLIW	+	+
TYFCAASPDSNYQLIW	+	+
TYFCAVDSNYQLIW	+	+
TYFCAASDNYQLIW	+	+
TYFCAASASSNYQLIW	+	+
TYFCAASASNYQLIW	+	+
TYFCAARGGGLS	+	+
TYFCAASESNYQLIW	+	+
TYFCAASGANTGGLS	+	+
TYFCAMVDSNYQLIW	+	+
TYFCAASGSGDSNYQLIW	+	+
TYFCAASRVGSNYQLIW	+	+
TYFCAAREWGNYQLIW	+	+

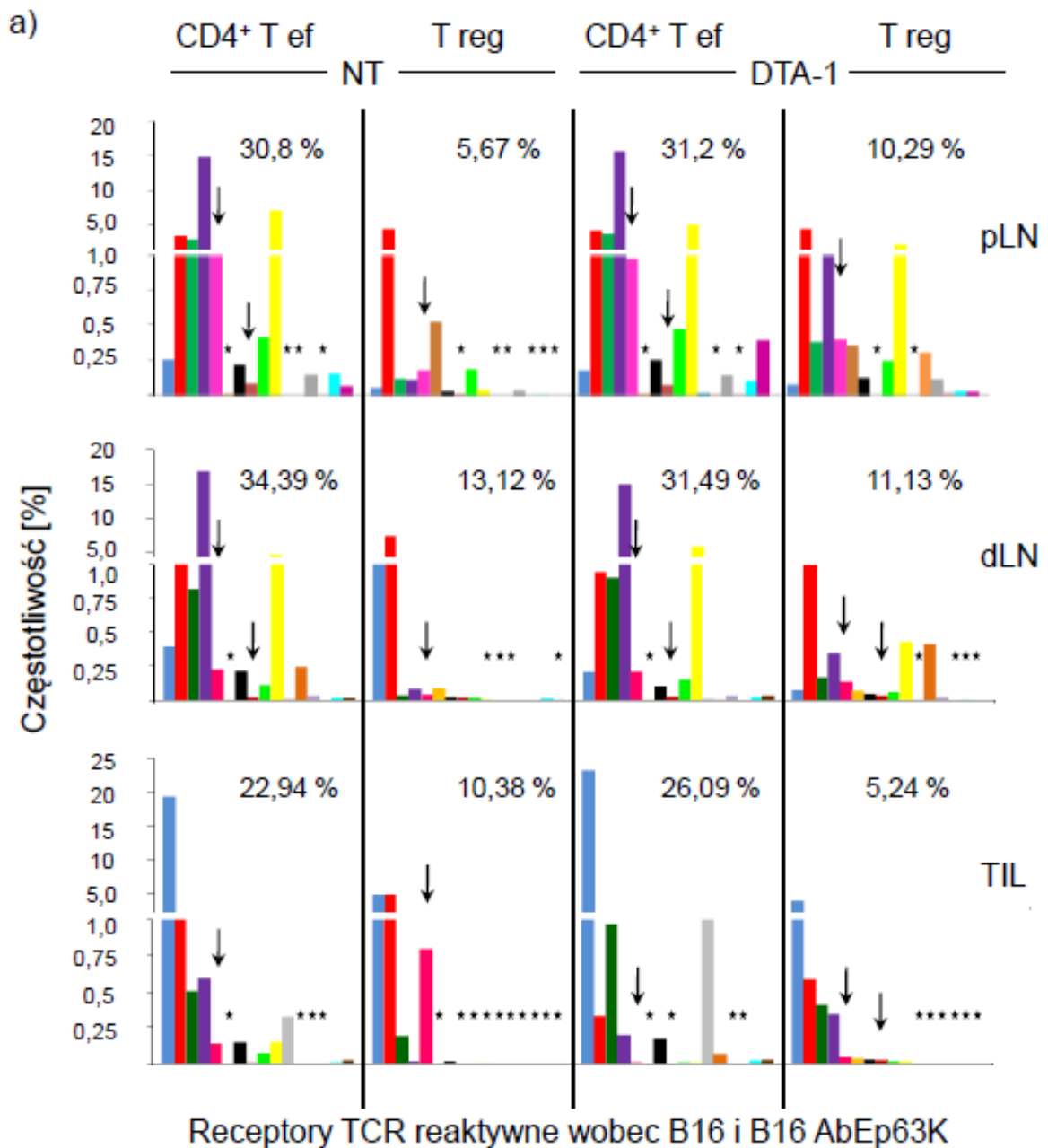


Ryc. 25. Reaktywność wybranych TCR hybrydom w kierunku B16 lub B16 A^bEp63K (kolor czerwony) oceniana przez indukcję ekspresji NFAT-GFP (a) lub wydzielanie IL-2 (b).

wobec nowotworu klonów. Występują one w normalnym repertuarze, często z wysoką częstotliwością, a ich receptory TCR nie różnicują się wyłącznie tylko w kierunku linii efektorowej czy regulatorowej. Rycina 5 wskazuje, że częstotliwości nowotworowo specyficznych TCR w pLN, dLN, TIL wynoszą 22-34% wszystkich klonów komórek efektorowych, ale tylko do 5-13% klonów T reg w wymienionych lokalizacjach. W przypadku komórek efektorowych nieleczenie bądź leczenie nie wpłynęło znacząco na częstotliwość swoistych nowotworowo receptorów, obecnych w pLN, dLN czy guzie. Z kolei częstotliwość swoistych receptorów T reg zmieniała się w zależności od lokalizacji anatomicznej. W pLN, infuzja DTA-1 zwiększa częstotliwość nowotworowo reaktywnych klonów T reg, ale w guzie ulega zredukowaniu. Ta obserwacja stosowana do klonów komórek T specyficznych (Ryc. 26) była zgodna z obserwowanym efektem biologicznym T reg, który wskazuje na ubytek masy guza po leczeniu DTA-1.

Następnie uzyskane dane z repertuarów receptorów TCR (specyficznych dla nowotworu CD4⁺ T ef i T reg w pLN, dLN i guzie u myszy leczonych i nieleczonych) analizowano zliczając reaktywne wobec nowotworu klony CD4⁺ T ef oraz T reg. Wnioski z tej analizy wskazują, że:

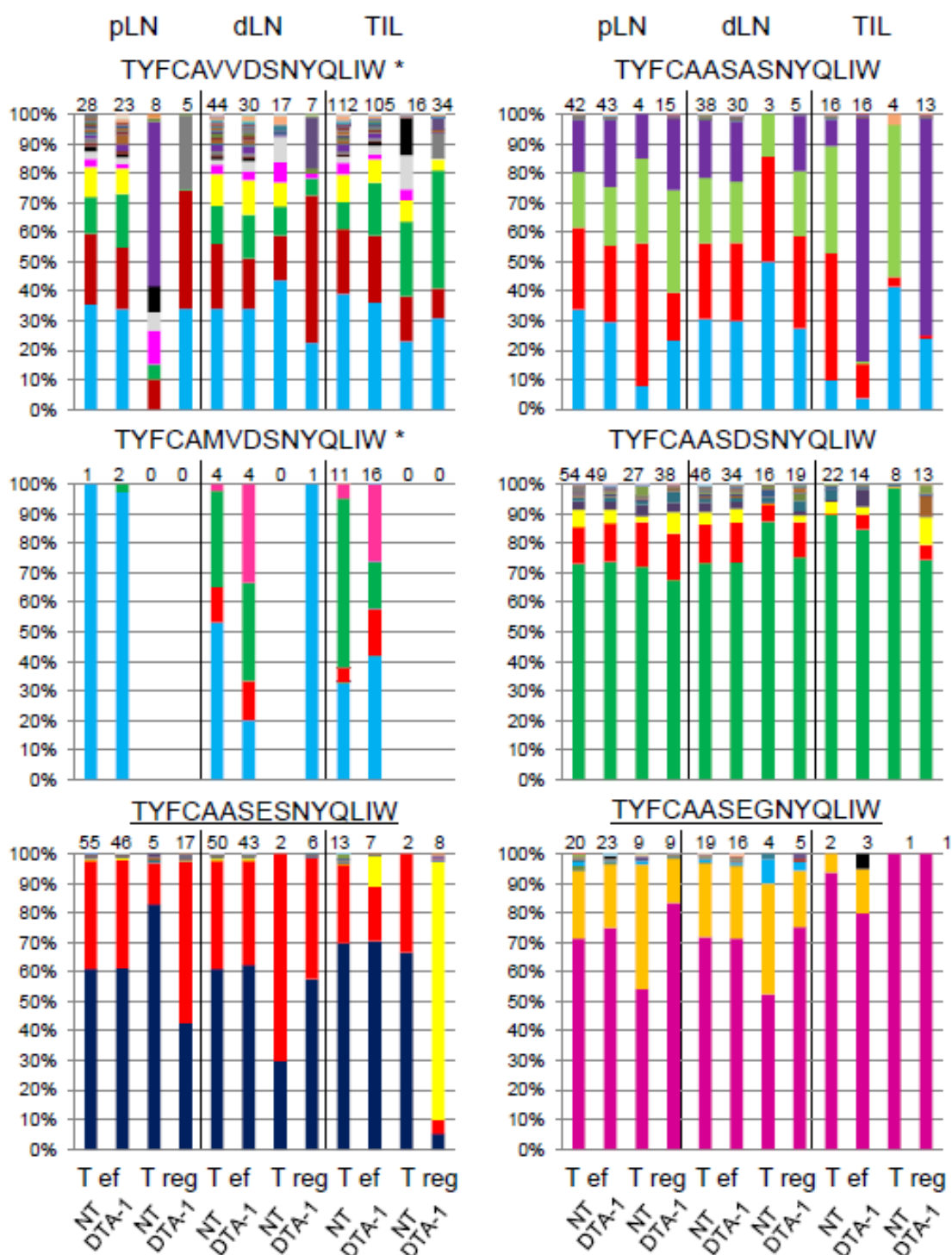
- najbardziej widoczne zmiany w różnorodności TCR, po leczeniu DTA-1, zaobserwowano w przypadku komórek regulatorowych w pLN i TIL, dla których zastosowane leczenie DTA-1 zwiększyło liczbę poszczególnych klonów, odpowiednio: z 9 na 14 i z 6 na 10,
- zwiększenie różnorodności TIL Treg, szczególnie klonów o niższej częstotliwości (Ryc. 34a, najniższy prawy panel).



Ryc. 26. Częstotliwości 16 reaktywnych TCR wobec antygenów B16: dwa z nich specyficzne dla neo-antygeny Ep63K (strzałki) wśród pLN, dLN i TIL komórek T CD4⁺. Słupki oznaczają poszczególne TCR (zaznaczone różnymi kolorami) ekspresjonowane na klonach CD4⁺ T ef i T reg z nieleczonych nowotworów (NT) lub myszy traktowanych DTA-1. Brak danego klonu jest zaznaczony gwiazdką.

4.7. Analiza różnorodności klonów Tef i Treg współdzielących ten sam nowotworowo –specyficzny repertuar TCR

Mechanizm leżący u podstaw zmian w różnorodności TCR komórek T reg i T ef znajdujących w pLN, dLN i TIL reaktywnych wobec nowotworu jest niejasny. Przeanalizowano częstość sekwencji nukleotydowych kodujących sześć najczęstszych nie specyficznych dla Ep63K i dwa TCR swoiste wobec Ep63K (Ryc. 27, dolne panele). Zaobserwowaliśmy, że liczba różnych sekwencji nukleotydowych kodujących dany TCR różni się (od 1 do 112). Większość TCR o wysokiej częstotliwości występowania zostały znalezione na T ef i T reg, co może świadczyć o konwersji T ef do T reg, w efekcie powodować wzrost różnorodności T reg. Z drugiej strony wykryto wiele rzadkich klonotypów, unikalnych dla T reg i T ef (dane niepublikowane). Takie sekwencje nukleotydowe są szczególnie wzbogacone w pLN, a w szczególności są obfity reprezentowane wśród TCR, których częstotliwość na poziomie aminokwasowym spadła na komórkach T ef po leczeniu DTA-1 (Tabela 15). Te obserwacje sugerują, że klonalna ekspansja T ef może następować równolegle z konwersją do T reg, deplecją związaną z działaniem DTA-1, zahamowaniem wzrostu komórek T ef zależnym od DTA-1, a także może promować rekrutację bardziej zróżnicowanej puli grasico-zależnych klonów T reg.



Ryc. 27. Rozkład i częstość pojedynczych sekwencji nukleotydów kodujących sześć reaktywnych wobec nowotworu B16 (trzy górne panele) i dwa specyficzne dla Ep63K (najniższy panel) TCR. Sekwencje aminokwasowe TCR α regionu CDR3 podano powyżej każdego wykresu. TCR wybrano zgodnie z najwyższą częstością w obrębie komórek CD4⁺ infiltrujących nowotwory (TIL). Barwy oznaczone kolorami reprezentują rozkład pojedynczych sekwencji nukleotydowych kodujących dany TCR w obrębie komórek T od węzłów chłonnych obwodowych (pLN), drenujących węzłów

chłonnych (dLN) po guz (TIL), nietraktowanych (NT) lub traktowanych DTA-1 myszy (DTA-1). Liczby nad każdym wykresem wskazują całkowitą liczbę sekwencji nukleotydowych kodujących dany TCR. Gwiazdka wskazuje sekwencje TCR, których różnorodność w guzie była wyższa niż w pLN.

Tabela 15. Zestawienie 16 sekwencji receptorów TCR hybrydom specyficznych wobec czerniaka B16, pochodzących z pLN, dLN, TILs, z repertuarem TCR zdrowej myszy TCRmini, nie obciążonej nowotworem. Dwie pierwsze sekwencje należą do grupy specyficznej wobec neo-antygeny Ep63K, pozostałe reaktywne względem endogennych antygenów czerniaka.

	pLN				dLN				TILs				pLN	
	NT		DTA-1		NT		DTA-1		NT		DTA-1		TCRmini	
	Tef	T reg	T ef	T reg	T ef	T reg	T ef	T reg	T ef	T reg	Tef	T reg	Tef	Treg
Ep63K														
TYFCAAPGTGGLS	0,08	0,00	0,07	-	0,07	0,06	0,09	0,13	0,01	-	-	0,02	-	-
TYFCAASEGAGGLS	0,00	0,52	0,00	0,35	0,00	0,36	0,00	0,27	0,00	-	0,00	0,04	-	0,24
Endogenne														
TYFCAASAKGSNYQLIW	0,14	0,03	0,14	0,11	0,12	-	0,12	0,07	-	-	-	-	0,53	-
TYFCAASEGNYQLIW	1,12	0,17	0,98	0,40	0,90	0,16	0,84	0,53	0,14	0,80	0,01	0,04	2,38	0,48
TYFCAASPDNSNYQLIW	7,10	0,03	5,06	2,16	4,74	0,02	5,97	1,72	0,15	0,00	0,01	0,01	1,59	-
TYFCAVVDNSNYQLIW	0,25	0,05	0,17	0,07	1,58	4,34	0,84	0,29	19,33	4,69	23,26	3,75	-	0,24
TYFCAASDNSNYQLIW	3,47	4,44	4,20	4,44	4,39	7,45	3,78	3,99	1,65	4,67	0,33	0,59	6,88	1,45
TYFCAASASSNYQLIW	0,15	0,00	0,10	0,02	0,06	0,05	0,08	0,00	0,01	-	0,02	-	-	-
TYFCAASASNYQLIW	2,93	0,11	3,69	0,38	3,28	0,13	3,61	0,67	0,50	0,19	0,97	0,41	5,29	-
TYFCAARGGGLS	0,41	0,18	0,47	0,24	0,44	0,06	0,62	0,23	0,07	-	0,01	0,01	0,26	0,48
TYFCAASESNYQLIW	14,88	0,10	15,67	1,67	16,89	0,33	14,97	1,38	0,59	0,01	0,20	0,34	11,38	0,24
TYFCAASGANTGGLS	0,06	-	0,39	0,02	0,06	0,00	0,12	-	0,02	-	0,02	-	-	-
TYFCAMVDSNYQLIW	-	-	0,01	-	0,03	-	0,03	0,01	0,33	-	1,03	0,00	-	-
TYFCAASGSGDSNYQLIW	0,01	-	0,01	-	0,01	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
TYFCAASRVGSNYQLIW	0,00	-	0,00	0,01	0,00	0,01	-	-	-	-	-	0,00	-	-
TYFCAAREWGNYSYQLIW	-	-	0,00	-	-	-	0,00	-	-	-	-	0,00	-	-

5. DYSKUSJA I WNIOSKI

Immunoterapia nowotworów jest stosunkowo nową gałęzią współczesnej medycyny, która stosowana łącznie z tradycyjnymi schematami chemioterapii lub samodzielnie, w wielu przypadkach z powodzeniem pomaga pacjentom nie reagującym na standardowe leczenie. Szczególną rolę w immunoterapii odgrywa stymulacja bądź blokada cząsteczek powierzchniowych, stanowiących punkty kontrolne układu odpornościowego (ang. immunological checkpoints) [Korman et al. 2006; Paluch et al. 2018]. Do takich cząsteczek należy receptor GITR. Dowiedziono, że stymulacja receptora GITR ma silne działanie przeciwnowotworowe, szczególnie w terapii czerniaka, które może być dodatkowo wzmożone poprzez jednoczesne blokowanie aktywacji cząsteczki CTLA-4 [Jun et al. 2010, Anz et al. 2011, Anik L. Côté et al. 2011].

W niniejszej rozprawie doktorskiej badano efekt przeciwnowotworowy podania przeciwciała DTA-1 (anty-GITR) w modelu myszy obciążonej guzem. Podjęto próbę zrozumienia wpływu przeciwciała anty-GITR na zmiany repertuaru receptorów antygenowych limfocytów T naciekających na guz nowotworowy oraz obecnych w węzłach chłonnych strażniczych oraz odległych u myszy obciążonych nowotworem. Dzięki dostępnej obecnie możliwości wysokoprzepustowej analizy repertuaru TCR, połączonej z oceną różnorodności użytecznych biomarkerów identyfikujących poszczególne populacje komórek oraz ich status aktywacji można podjąć próbę odpowiedzi na pytania czy immunoterapia powoduje zawężenie czy poszerzenie repertuaru receptorów TCR poszczególnych populacji, czy wywołuje zmiany w proporcji limfocytów aktywowanych do naiwnych oraz czy wpływa na rozplem czy też ubytek poszczególnych populacji limfocytów.

Wyniki przytoczone w tej pracy potwierdzają skuteczność przeciwnowotworową przeciwciała DTA-1, zarówno na mysim modelu C57BL/6 jak i TCR^{mini}Foxp3^{GFP}. Jednokrotne podanie tego przeciwciała do ośmiu dni po przeszczepieniu komórek czerniaka powoduje istotne zahamowanie wzrostu guza, co jednak jest nieskuteczne w zaawansowanym stadium wzrostu nowotworu (dane niepublikowane). Wydaje się, że podanie DTA-1 na wczesnym etapie rozwoju nowotworu działa dwójako, w zależności od typu komórek do których się wiąże. Nocentini i współpracownicy sugerują, że ligacja receptora GITR może promować przeżycie i rozplem zarówno konwencjonalnych limfocytów T efektorowych (CD4 i CD8), ale też limfocytów T reg.

Szczególnie efekt ten widoczny jest przy zastosowaniu rekombinowanego ligandu GITR lub pentamerycznego rekombinowanego przeciwciała pozbawionego regionów Fc [Nocentini et al. 2018; Placke et al. 2010]. Co zatem jest czynnikiem promującym skuteczność immunoterapii przeciwciałem anty-GITR?

Terapeutyczne zastosowanie przeciwciał niektórych izotypów wiąże się z bezpośrednią (zależną od dopełniacza i / lub komórkową) cytotoksycznością. W przypadku DTA-1 mówimy o efekcie cytolitycznym, który jest wprost proporcjonalny do liczby cząsteczek receptora GITR na powierzchni komórki. Najwyższy poziom ekspresji znajduje się powierzchni aktywowanych limfocytów T regulatorowych (Ryc. 21). W trakcie prowadzonych eksperymentów zaobserwowano, że podanie przeciwciała DTA-1 myszom obciążonym nowotworem prowadzi do częściowej deplecji limfocytów T reg we wszystkich narządach limfatycznych, w tym również odległych względem wzrostu guza węzłów chłonnych (pLN), gdzie jednocześnie występuje znaczny wzrost odsetka i różnorodności reaktywnych wobec guza komórek regulatorowych. Z kolei obserwując efekt działania DTA-1 w guzie możemy zauważyć, że odsetek limfocytów T reg oraz jego różnorodność ulega zmniejszeniu (Ryc. 26, dolny prawy panel). Ta obserwacja może odzwierciedlać zróżnicowany wpływ środowiska zapalnego/kontekstu komórkowego charakteryzującego tkankę nowotworową na wrażliwość T reg na działanie przeciwciała DTA-1. Jednakże, Nocentini i współpracownicy wskazują również na negatywne efekty terapii przeciwciałami w dłuższej perspektywie czasowej. Sugerują możliwy wzrost liczby komórek T reg lub spowodowanie „burzy cytokinowej” wywołanej chroniczną ligacją cząsteczki GITR. Zaktywowana cząsteczka GITR może sprzyjać ekspansji efektorowych limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ reaktywnych wobec własnych antygenów, prowadząc do reakcji autoimmunologicznych. Jednocześnie badacze Ci dodają, że obecnie użycie przeciwciał anty DTA-1 w terapii wydaje się być lepszym rozwiązaniem niż użycie rekombinowanych cząsteczek ligandu GITR (GITR-L), właśnie ze względu na skuteczniejszą aktywację limfocytów T efektorowych oraz znaczący efekt cytotoksyczny wobec limfocytów Treg [Nocentini et al. 2018].

GITR jest cząsteczką ko-stymulatorową, odgrywającą istotną rolę w aktywacji efektorowych limfocytów T [Clouthier DL et al. 2014]. Jego działanie w mysich modelach nowotworów w postaci aktywacji limfocytów CD4⁺ a zwłaszcza wzrostu liczby i aktywności komórek T CD8⁺ [Schaer et al. 2012, Ko K et al. 2005]. Wyniki

badania przytoczone w tej pracy wskazują, że podanie przeciwciała DTA-1 powoduje zwiększenie proporcji limfocytów T efektorowych w czasie odpowiedzi przeciwnowotworowej w środowisku guza u myszy TCR^{mini}Foxp3^{GFP}. Natomiast proporcja limfocytów T regulatorowych ulega zmniejszeniu (Ryc. 19). Ciekawe, że pomijając wpływ przeciwciała anty-GITR, większość komórek regulatorowych i efektorowych infiltrujących nowotwór wyraża marker aktywacji CD62L^{low} oraz posiada podwyższony poziom receptora GITR (Ryc. 20, 21). Wyniki innych badaczy pokazują, że ekspresja GITR w limfocytach Treg jest około dziesięciokrotnie wyższa niż ekspresja GITR w aktywowanych przez nowotwór limfocytach T CD8⁺ CD4⁺, co może sugerować, że GITR jest dobrym markerem aktywowanych limfocytów Treg naciekających nowotwór [Cohen AD et al. 2010; Ronchetti S et al. 2015].

Liczne badania wskazują, że istnieje bardzo silna zależność pomiędzy wzrostem odsetka limfocytów T reg a wyższym stopniem zaawansowania choroby i tym samym gorszym całkowitym przeżyciem. Darrase-Jeze i współpracownicy zauważyli ten trend jako szybki i ciągły wzrost proporcji oraz liczby całkowitej komórek T reg w węzłach strażniczych (dLN) u myszy C57BL/6 obciążonych komórkami melanomy B16F10 ale także myszy BALB / c, którym przeszczepiono komórki guza sutka 4T1 [Darrase-Jeze et al. 2009]. Eksperymenty przeprowadzone w tej pracy również potwierdzają wymienione powyżej obserwacje.

W niniejszej pracy wykorzystano myszy o zawężonym repertuarze TCR w celu określenia zróżnicowania receptorów TCR oraz dokładnego prześledzenia udziału limfocytów CD4 efektorowych i regulatorowych w trakcie choroby nowotworowej i terapii przeciwciałem anty-GITR. Ekspresja zielonego białka GFP pozwoliła na wyróżnienie i zbadanie naturalnych limfocytów T reg w organizmie myszy. Dzięki zastosowaniu wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA (Ion Torrent) udało się zidentyfikować receptory TCR specyficzne wobec komórek nowotworowych. Co ciekawe, wszystkie 16 zidentyfikowanych receptorów, włącznie z dwoma specyficznymi dla antygeny A^bEp63K, obecne są z różnymi częstotliwościami na limfocytach efektorowych i regulatorowych. Niestety, ze względu na brak dokładnych markerów konwersji T ef do T reg lub vice versa, nie udało się jednoznacznie stwierdzić czy wspólne receptory TCR są wynikiem konwersji T ef do T reg czy też efektem selekcji grasicozależnych komórek T reg z niezależnych prekursorów. Analiza ekspansji pojedynczych klonów o wspólnym receptorze TCR

wykazała, że większość z nich była obecna w guzie, co wspiera mechanizm konwersji. Nieliczne klony, szczególnie w obwodowych węzłach chłonnych można było znaleźć wyłącznie wśród populacji T reg, co sugeruje, że obydwa mechanizmy (konwersja i niezależna selekcja) mogą przyczyniać się do współdzielenia TCR o tych samych sekwencjach aminokwasowych i nukleotydowych (Ryc. 27, Tabela 15).

Terapia przeciwciałem DTA-1 nie zwiększa poliklonalności komórek efektorowych także w ocenie globalnej różnorodności limfocytów T efektorowych (Ryc. 24a) ani różnorodności klonów swoistych wobec nowotworu (Ryc. 27). Zaobserwowano, że repertuar komórek efektorowych zaangażowanych w odpowiedź przeciwnowotworową pozostaje w przybliżeniu stały u myszy traktowanych i nietraktowanych przeciwciałem DTA-1. Natomiast wzrasta różnorodność receptorów TCR limfocytów T reg (Ryc. 24a, 27). Poczyniona obserwacja jest zgodna z obserwowanym przez innych badaczy efektem stymulacji receptora GITR na rozplem naiwnych, lecz nie aktywowanych klonów T reg [Kim et al. 2015]. Nasze badania ukazały, że wprowadzonych metodami inżynierii genetycznej do komórek czerniaka B16 neoantigen Ep63K, może być rozpoznawany przez receptory TCR współdzielone przez limfocyty T efektorowe i T regulatorowe. Tym samym uzasadniony wydaje się postulat immunoedycji dominujących klonów limfocytów T reg, zaangażowanych w kontrolowanie efektorowej odpowiedzi przeciwnowotworowej [Darrase-Jaze et al. 2009].

Jednokrotne podanie przeciwciała DTA-1 spowalnia wzrost guza, nie eliminując go całkowicie. Zaobserwowano, że wraz z zahamowaniem wzrostu guza następuje zwiększenie stosunku limfocytów infiltrujących guz do komórek nowotworowych B16 A^bEp63K. Z kolei odsetek limfocytów regulatorowych w obrębie populacji limfocytów infiltrujących guz i limfocytów T z węzłów chłonnych zmniejszyła się, a proporcja limfocytów T CD4⁺ efektorowych wzrastała (Ryc. 18a) (Ryc. 19a, b).

Uważamy, że brak odrzucenia guza, w tym przypadku, może być spowodowany zwiększoną różnorodnością receptorów TCR drugiej fali powstałych *de novo* komórek T reg, które tym samym mogły lepiej konkurować z komórkami efektorowymi o te same antygeny nowotworowe. Wydaje się, że przeciwciała DTA-1 eliminuje aktywowane limfocyty T reg, odpowiedzialne za wstępne utrzymanie tolerancji immunologicznej w niszy wzrostu guza. Z czasem jednak, wyczerpanie aktywności przeciwciała lub/i wydzielanie przez komórki czerniaka czynników chemotaktycznych powoduje

uzupełnianie/ napływ do niszy nowotworowej puli nowo powstałych limfocytów T regulatorowych. Limfocyty te ekspresjonują szereg receptorów TCR, zdolnych do konkurencji z limfocytami efektorowymi o rozpoznanie tych samych antygenów nowotworowych, które mogą utrudniać całkowite wyeliminowanie nowotworu. Z kolei Nocentini i współpracownicy sugerują, że kluczowym aspektem indukcji odrzucenia guza przez leczenie DTA-1 wydaje się być zwiększenie stosunku komórek CD8⁺ do T reg w mikrośrodkowisku guza oraz bezpośrednia stymulacja konwencjonalnych komórek T CD8⁺ i CD4⁺ zwiększających wydzielanie IFN- γ i zabijanie nowotworu przez komórki T CD8⁺ [Nocentini et al. 2018].

Pomimo zauważalnego, statystycznie istotnego, efektu terapeutycznego w postaci zahamowania choroby negatywny wpływ na całokształt pracy i próbę odpowiedzi na formułowane zadania badawcze, miały aspekty techniczne. Projekt zakładał pozyskanie jak największej grupy myszy, o zawężonym repertuarze receptorów TCR. Problemy z rozrodem szczepu TCR^{mini}Foxp3^{GFP} spowodowały ograniczenia w prowadzeniu eksperymentów. Po uzyskaniu materiału do badań, w postaci węzłów chłonnych (pLN, dLN) oraz guzów, sortowano za pomocą sortera ARIA wybrane populacje komórek regulatorowych i efektorowych. Dużym wyzwaniem dla eksperymentów okazało się uzyskanie z masy nowotworowej jak największej liczby limfocytów. Powodem takiego stanu rzeczy były zbyt duże guzy w przypadku myszy nie leczonych (im większy nowotwór tym mniejszy uzysk naciekających go limfocytów) lub zbyt małe przy osobnikach leczonych (mniej materiału do sortowania).

Po zastosowaniu terapii przeciwciałem DTA-1, wysortowano populacje komórek T reg i T ef, następnie poddano je fuzji z komórkami linii BWNFATGFP, otrzymując hybrydomy. Spora część limfocytów ze środowiska guza nie przeżyła jednak etapu sortowania lub fuzji, dlatego zdecydowano się na pozyskanie hybrydom z węzłów chłonnych strażniczych dLN, co było pewnym kompromisem. Kolejnym etapem było testowanie hybrydom pod kątem specyficzności wobec peptydu Ep63K, obecnego na komórkach czerniaka. Większość uzyskanych hybrydom odpowiadała zarówno na neoantygen z komórek czerniaka wyrażającego antygen AbEp63K jak i czerniaka wyjściowego B16 WT, a sekwencjonowanie ich receptora TCR wskazywało, że są to często te same klony, co sugeruje, że inne antygeny nowotworowe niż Ep63K zdominowały odpowiedź immunologiczną wobec komórek czerniaka.

Podsumowując, analiza repertuaru TCR limfocytów T jest nieocenionym narzędziem do monitorowania skuteczności immunoterapii, a także izolacji receptorów TCR o wysokim powinowactwie wobec antygenów nowotworowych, które mogą być użyteczne do prób adoptywnego transferu limfocytów T w ramach immunoterapii spersonalizowanej. Uważa się, że skuteczna immunoterapia to taka, która zwiększa różnorodność limfocytów T efektorowych w guzie bez znaczącego wpływu na różnorodność repertuaru obwodowego [Scirka et al. 2017].

WNIOSKI:

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że:

- jednokrotne podanie przeciwciała DTA-1 wpływa na zahamowanie wzrostu nowotworu (czerniaka B16) w mysim modelu C57Bl/6 i TCR^{mini}Foxp3^{GFP}. Wzmacnia efektorową odpowiedź limfocytów T, jednocześnie zaburzając akumulację limfocytów regulatorowych naciekających na guz.
- analiza repertuaru receptorów TCR limfocytów T CD4 wykazała, że dominujące klony limfocytów T efektorowych, reaktywnych wobec nowotworu, posiadają podobną częstość zarówno u myszy leczonych jak i nieleczonych przeciwciałem DTA-1.
- zarówno obwodowy repertuar receptorów TCR komórek T reg jak i ten związany z guzem przechodzi, związaną z podaniem DTA-1, immuoedycję. Zmiana charakteryzuje się deplecją dominujących klonów oraz pojawieniem się bardziej zróżnicowanych klonów o niskiej częstotliwości, które w znacznym stopniu współdzielą receptory TCR z komórkami T efektorowymi.
- przeciwciała DTA-1 eliminuje aktywowane komórki T reg w obrębie guza, które są zaangażowane w utrzymanie tolerancji wobec wzrastającego nowotworu. Równolegle jednak faworyzuje rozplam i rekrutację obwodowych limfocytów T reg, które z biegiem czasu naciekają na nowotwór. Z racji zwiększonej różnorodności, limfocyty te (tzw. drugiej fali) posiadają szereg receptorów TCR, zdolnych do konkutowania z limfocytami efektorowymi o rozpoznanie tych samych antygenów nowotworowych, co może utrudniać całkowite wyeliminowanie nowotworu.

6. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

- ABC – transmembranowe transportery
- ACT – (ang. *Adoptive Cell Transfer*)
- ADAM-9 – (ang. *Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing protein 9*),
- AICD – (ang. *Activation-Induced Cell Death*)
- AIRE – (ang. *Autoimmune Regulator*)
- AKR – myszy AKR rozwijające białaczki
- AP-1 – (ang. *Activator Protein 1*)
- AP-2 α – (ang. *Activating Enhancer Binding Protein 2 Alpha*)
- APC – (ang. *Antigen Presenting Cells*)
- Apo-1L – CD95 ligand/ Fas ligand
- ATP – (ang. *Adenosine Triphosphate*)
- B – (ang. *B cells*)
- B16 – melanoma B16
- B7 – białko obecne na powierzchni komórek APC
- BAGE – gen kodujący TAA
- Bcl-2 – (ang. *B-cell lymphoma 2*)
- BCL2 – anty-apoptotyczne cząsteczki
- BCR – (ang. *B-cell Receptor*)
- bFGF – proangiogeny czynnik
- BMT – (ang. *Bone Marrow Transplantation*)
- C5a, C3a - fragmenty dopełniacza
- CAFs – (ang. *Cancer Associated Fibroblasts*)
- CARs – (ang. *Chimeric Antigen Receptors*)
- CCL – (ang. *Chemokine (C-C motif) ligand*)
- CD – (ang. *Cluster of Differentiation*)
- CDK4 – (ang. *Cyclin-Dependent Kinase 4*)
- CDR – (ang. *Complementarity Determining Region*)
- CEA – (ang. *Carcinoembryonic antigen*)
- Chk1 i Chk2 – kinazy
- c-Kit – (ang. *tyrosine-protein kinase Kit, CD117*)
- COX-2 – (ang. *Cyclooxygenase-2*)
- CpG – niemetylowane sekwencje (dinukleotydy cytozyno-guaninowe) CpG

CREB – (ang. *cAMP Response Element-Binding Protein*)
c-Rel –
CSCs – (ang. *Cancer Stem Cells*)
CSF-1 – (ang. *Colony Stimulating Factor*)
CTLA-4 – (ang. *Cytotoxic T cell Antigen 4*)
CXCL – chemokina należąca do rodziny CXC
CXCR4 – (ang. *CXC-chemokine receptor 4*), receptor chemokin
C α – (ang. *Constant Segment α*)
DC – (ang. *Dendritic Cells*)
DN – (ang. *Double Negative*)
DNA – (ang. *Deoxyribonucleic Acid*)
DP – (ang. *Double Positive*)
D β – (ang. *Diversity Segment β*)
ECM – (ang. *Extracellular Matrix*)
ELAM-1 – (ang. *Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1*)
EphB4 – białka
ERK – (ang. *Extracellular signal-Regulated Kinase*)
Ets-1 – czynnik transkrypcyjny
FAP – (ang. *Fibroblast Activation Protein*)
Fas – (ang. *Fas Protein*)
FasL – (ang. *Fas Ligand*)
Fc – (ang. *Fragment crystallizable*)
FGL2 – (ang. *Fibrinogen Like Protein*)
FMLP – (*N-formylmethionyleucynofenyloalanina*)
FoxP3 – (ang. *Forkhead box P3*)
G1/G0 – fazy cyklu komórkowego
GAGE – gen kodujący TAA
GATA-3 – (ang. *GATA binding protein 3*)
GITR – (ang. *Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor*)
GM-CSF – (ang. *Granulo- cyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor*)
gp 100 – (ang. *Glycoprotein 100*)
GVHD – (ang. *Graft-Versus-Host-Disease*)
HA – (ang. *Hyaluronic Acid*)
HIF-1 – (ang. *Hypoxia-inducible factor-1*)

ICAM-1 – (ang. *Intercellular Adhesion Molecule 1*)
ICOS – (ang. *Inducible T-cell COStimulator*)
iDC – (ang. *Immature Dendritic Cells*)
IDO – (ang. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*)
IgA, IgE, IgG, IgM – Immunoglobuliny (A, E, G, M)
IGF-1 – (ang. *Insulin-like growth factor-1*)
IL – Interleukina
INF- γ – Interferon γ
iNOS – (ang. *Inducible Nitric Oxide Synthase*)
IP10 – (ang. *IFN- γ -inducible protein 10*), CXCL10
IP3 – 1,4,5-trifosforan inozytolu
IPEX – (ang. *Immunodysregulation, Polyendocrinolopathy, Enteropathy, X-linked syndrome*)
iT reg – (ang. *Inducible T regulatory cell*)
ITAM – (ang. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*)
JAMs – (ang. *Junctional Adhesion Molecules*)
J α – (ang. *Joining Segment α*)
LAG3 – (ang. *Lymphocyte-activation gene 3*)
LAK – (ang. *Lymphokine Activated Killers*)
LGD-3 – (ang. *Lethal Giant Discs*)
LTB₄ – leukotrien
MAGE-1 – gen kodujący TAA
MBP – (ang. *Mannan-binding protein*)
MCAM – (ang. *Melanoma Cell Adhesion Molecule*)
MCP-1 – chemokina
M-CSF – (ang. *Macrophage Colony-Stimulating Factor*)
MDSC – (ang. *Myeloid - Derived Suppressor Cell*)
MHC – (ang. *Major Histocompatibility Complex*)
MICA – (ang. *MHC class I chain-related protein A*)
MIG – (ang. *Monokine Induced by Gamma interferon*)
MIP-1 α – chemokina
MITF – (ang. *Microphthalmia-Associated Transcription Factor*)
MMP1 – (ang. *Matrix metalloproteinase*)

N – (ang. *non-template encoded*)
NFAT – (ang. *Nuclear Factor of Activated T-cells*)
NFκB – (ang. *Nuclear Factor Kappa-Light-chain-enhancer of activated B cells*)
NK – (ang. *Natural Killer cells*)
NKT – (ang. *Natural killer T cells*)
NO – (ang. *Nitric Oxide*)
NOTCH1 – NOTCH receptor 1
nT reg – naturalne komórki T reg
OX40 – CD134
P – (ang. *palindromic sequences*)
p53 – białko supresorowe guza
PBLs – (ang. *Peripheral Blood Lymphocytes*)
PCR – (ang. *Polymerase Chain Reaction*)
PD-1 – (ang. *Programmed cell Death protein 1*)
PDGF – (ang. *Platelet Derived Growth Factor*),
PD-L1 – (ang. *Programmed Death-Ligand 1*)
PF4 – (ang. *Platelet Factor-4*)
PGE2 – prostaglandyna
pre-TCR – (ang. *pre-T cell receptor*)
PSA – (ang. *Prostate-Specific Antygen*)
RAG1 – (ang. *Recombination Activating Gene 1*)
RANTES – chemokina,
Ras – onkogen
ROR-γ – (ang. *Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma*),
RSS – (ang. *Recombination Signal Sequences*)
SC – (ang. *Scatter Factor*)
SCF – (ang. *stem cells factor*) (ligand KIT)
scFv – (ang. *single chain Fragment variable*)
SDF – (ang. *Stromal cell-Derived Factor*)
SIAE – (ang. *Sialic Acid Acetylerase*)
Smad 3 – białko, bezpośrednia sygnalizacja z receptorem TGF-β
SP – (ang. *Single Positive*)
SSMD – (ang. *Site-Specific Metastatic Dissemination*)
STAT1 – (ang. *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*)

T_{ef} – (ang. *T effector cells*)
T_{reg} – (ang. *T regulatory cells*)
T $\alpha\beta$ – limfocyty T alfa/ Beta
T $\gamma\delta$ – limfocyty T gamma/ delta
TAA – (ang. *Tumor Associated Antigens*)
TAM – (ang. *Tumor Associated Macrophages*)
T-bet – (ang. *T-box protein expressed in T cells*)
TCR – (ang. *T cell Receptor*)
TdLN – (ang. *Tumor Draining Lymphodes*)
TdT – (ang. *Terminal Nucleotidyl Transferase*)
TEM – (ang. *TIE-2 – expressing monocytes*)
TGF β – (ang. *Transforming Growth Factor β*), cytokina
Th – (ang. *Helper T cell*)
TICs – (ang. *Tumor Initiating Cells*)
TIL's – (ang. *Tumor Infiltrating Cells*)
TLR – (ang. *Toll-Like Receptor*)
TNF – (ang. *Tumor Necrosis Factor*)
TNF(R) – (ang. *Tumor Necrosis Factor (Receptor)*)
TNFRSF – (ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily*)
TNF- α – (ang. *Tumor Necrosis Factor alpha*)
Tr 1 – Komórki regulatorowe typu 1
TRAIL – (ang. *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*)
TRAIL-DR5 – (ang. *Tumor-Necrosis-Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Death Receptor 5*)
TSA – (ang. *Tumor Specific Antigens*)
tTreg – (ang. *thymus-derived Treg cells*)
VCAM-1 – (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*)
VEGF – (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*)
V α – (ang. *Variable Segment α*)
V β – (ang. *Variable Segment β*)
 β 4 – integryna
4-1BB – CD137, receptor powierzchniowy komórek T

7. SPIS TABEL I RYSUNKÓW

7.1. Tabele

Tabela 1	Przykłady punktów kontrolnych oraz przeciwciał je blokujących w immunoterapii nowotworów.....	43
Tabela 2	Poziom ekspresji białka GITR na powierzchni komórek.....	46
Tabela 3	Skład pożywki hodowlanej dla komórek hybridoma produkujących przeciwciało DTA-1, limfocytów T wyizolowanych z narządów limfoidalnych myszy oraz grasiczaka BW NFAT GFP.....	53
Tabela 4	Skład pożywki hodowlanej dla czerniaka B16 A ^b Ep63K.....	53
Tabela 5	Media selekcyjne stosowane w trakcie wyprowadzania homogenych linii komórkowych hybridoma swoistych wobec antygeny Ep63K.....	54
Tabela 6	Podstawowe bufor wykorzystywane przy izolacjach komórkowych, hodowli komórek, cytometrii przepływowej (FACS), testach funkcjonalnych.....	54
Tabela 7	Bufory i żele wykorzystywane w biologii molekularnej.....	55
Tabela 8	Przeciwciała zastosowane w genotypowaniu myszy transgeniczných.....	55
Tabela 9	Przeciwciała zastosowane w analizie cytofluometrycznej.....	56
Tabela 10	Startery zastosowane w genotypowaniu myszy transgeniczných.....	56
Tabela 11	Startery wykorzystane do syntezy cDNA, amplifikacji fragmentów CDR3 TCR α	57
Tabela 12	Zestaw tagów użytych w tworzeniu bibliotek regionów CDR3.....	57
Tabela 13	Zestaw odczynników użytych w doświadczeniach.....	58

Tabela 14	Sprzęt laboratoryjny i plastik używany podczas eksperymentu...	59
Tabela 15	Zestawienie 16 sekwencji receptorów TCR hybrydom specyficznych wobec czerniaka B16, pochodzących z pLN, dLN, TILs, z repertuarem TCR zdrowej myszy TCRmini, nie obciążonej nowotworem.....	108

7.2. Rysunki

Ryc. 1	Struktura Zachorowań w zależności od płci i wieku.....	13
Ryc. 2	Zdjęcie czerniaka w początkowej fazie choroby.....	14
Ryc. 3	Schemat zależności poziomu komórek T reg na rozwój chorób...	27
Ryc. 4	Teoria immunoeditingu nowotworów.....	31
Ryc. 5	Model funkcjonowania cząsteczki GITR podczas odpowiedzi immunologicznej.....	50
Ryc. 6.	Schemat konstrukcji konwencjonalnego transgenicznego receptora TCR.....	62
Ryc. 7	Schemat przedstawiający strategię wykonywania badań.....	64
Ryc. 8	Schemat przebiegu eksperymentów na myszach.....	65
Ryc. 9	Analiza cytofluorymetryczna mini repertuaru oraz fenotypu myszy TCR ^{mini} FOXP3 ^{GFP}	68
Ryc. 10	Schemat bramkowania sortowanych populacji z guza nowotworowego.....	69
Ryc. 11	Schemat poglądowy wykonania testu HT-2.....	73
Ryc. 12	Przykładowa biblioteka z przyłączonymi tagami.....	81
Ryc. 13	Schemat poglądowy technologii sekwencjonowania na platformie Ion Torrent.....	84

Ryc. 14	Ekspresja transgenicznego receptora TCR na komórkach CD4 ⁺ węzłów chłonnych myszy TCR ^{mini} Foxp3 ^{GFP} oraz fenotyp CD4/CD8 i CD4/Foxp3 węzłów chłonnych.....	86
Ryc. 15	Ekspresja antygeny A ^b Ep63K na modyfikowanych komórkach czerniaka B16.....	87
Ryc. 16	Opracowanie protokołu immunoterapii czerniaka B16 A ^b Ep63K przeciwciałem DTA-1 na myszach WT ^{GFP}	88
Ryc. 17	Wpływ immunoterapii przeciwciałem DTA-1 u myszy TCR ^{mini} Foxp3 ^{GFP} obciążonej nowotworem B16 A ^b Ep63K.....	89
Ryc. 18	Stosunek limfocytów T infiltrujących nowotwór (TIL) do komórek czerniaka B16 A ^b Ep63K (a) i procent T reg w całkowitej liczbie limfocytów T CD4 ⁺	90
Ryc. 19	Analiza cytofluorymetryczna proporcji limfocytów T efektorowych i regulatorowych w czasie odpowiedzi przeciwnowotworowej.....	91
Ryc. 20	Analiza cytofluorymetryczna ekspresji receptora CD62L	92
Ryc. 21	Analiza cytofluorymetryczna ekspresji receptora GITR.....	93
Ryc. 22	Porównanie dominujących receptorów TCR ekspresjonowanych przez komórki T CD4 ⁺ efektorowe i regulatorowe u zdrowych i obciążonych nowotworem myszy TCR ^{mini} Foxp3 ^{GFP}	95
Ryc. 23	Wpływ leczenia DTA-1 na repertuar receptorów TCR komórek CD4 ⁺ T ef i T reg w pLN, dLN, guzach myszy TCR ^{mini} Foxp3 ^{GFP} obciążonych nowotworem.....	97
Ryc. 24	Porównanie podobieństwa pomiędzy repertuarami receptorów TCR komórek T ef i klonów T reg z węzłów chłonnych (dLN i pLN), śledziony (spl) i nacieków nowotworowych (TIL) z nietraktowanych (NT) i traktowanych DTA-1 (DTA-1) u myszy TCR ^{mini} Foxp3 ^{GFP}	100
Ryc. 25	Reaktywność wybranych TCR hybrydom w kierunku B16 lub B16 A ^b Ep63K	103
Ryc. 26	Częstotliwości 16 reaktywnych TCR B16.....	105

Ryc. 27	Rozkład i częstość pojedynczych sekwencji nukleotydów kodujący sześć reaktywnych wobec nowotworu B16 TCR	107
---------	--	-----

7.3. Strony internetowe

<http://onkologia.org.pl/czerniak-skory-c43/>

[https://pl.wikipedia.org/wiki/Czerniak_\(nowotw%C3%B3r\)](https://pl.wikipedia.org/wiki/Czerniak_(nowotw%C3%B3r))

8. LITERATURA

1. Afkarian, M., et al., T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nature immunology*: 3(6), p. 549-57 (2002)
2. Amiri K.I., Richmond A.: Role of nuclear factor-kappaB in melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*: 24, 301–313 (2005)
3. Côté Anik L., Peisheng Zhang, Jeremy A. O'Sullivan, Valerie L. Jacobs, Carli R. Clemis, Shimon Sakaguchi, José A. Guevara-Patiño and Mary Jo Turk Stimulation of the Glucocorticoid-Induced TNF Responses to Tumor-Specific Antigens Cells Induces Protective and High-Avidity T Cell Receptor Family-Related Receptor on CD8 T J *Immunol*: 186, 275-283 (2011)
4. Ariga, H., et al., Instruction of naive CD4+ T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development: roles of T-cell receptor-mediated signals. *Immunology*: 122(2), p. 210-21 (2007)
5. Ashraful Haque, Amanda C. Stanley, Fiona H. Amante, Fabian de Labastida Rivera, YongHong Zhou, Rachel D. Kuns, Vanessa Yardley, Shimon Sakaguchi, Geoffrey R. Hill, and Christian R. Engwerda. Therapeutic Glucocorticoid-Induced TNF Receptor-Mediated Amplification of CD4+ T Cell Responses Enhances Antiparasitic Immunity. *The Journal of Immunology*: 184, 2583–2592 (2010)
6. Basu B., Biswas S., Wrigley J., Sirohi B., Corrie P.: Angiogenesis in cutaneous malignant melanoma and potential therapeutic strategies. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*: 9, 1583-1598 (2009)

7. Bedogni B., Powell M.B.: Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment Cell Melanoma Res.*: 22, 166-174 (2009)
8. Betts GJ, Clarke SL, Richards HE, Godkin AJ, Gallimore AM. Regulating the immune response to tumours. *Advanced Drug Delivery Reviews*: 58, 948- 961 (2006)
9. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology*: 23, 488-496 (2009)
10. Bilate AM, Lafaille JJ: Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol.*: 30, 733-758 (2012)
11. Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen TJ. Abundance-based similarity indices and their estimation when there are unseen species in samples. *Biometrics*: 62 (2), 361-371 (2006)
12. Chorąży-Massalska M, Kontny E, Maśliński W. The immune response control by natural (CD4⁺CD25⁺) regulatory T cells. *Post Bil Kom* 2006; 33: 772-778 (2006)
13. Clouthier DL, Watts TH. Cell-specific and context-dependent effects of GITR in cancer, autoimmunity, and infection. *Cytokine & growth factor reviews*; 25(2):91-106 (2014)
14. Cohen AD, Schaer DA, Liu C, et al. Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One*;5 (2010)
15. Ronchetti S, Ricci E, Petrillo MG, et al. Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor-related protein: a key marker of functional regulatory T cells. *Journal of immunology research*; 2015:171520 (2015)
16. Cohen Adam D, Adi Diab, Miguel-Angel Perales, Jedd D. Wolchok, Gabrielle Rizzuto, Taha Merghoub, Deonka Huggins, Cailian Liu, Mary Jo Turk, Nicholas P. Restifo, Shimon Sakaguchi, and Alan N. Houghton. Agonist Anti-GITR Antibody Enhances Vaccine-Induced CD8⁺ TCell Responses and Tumor Immunity. *Cancer Res.*: 66(9), 4904–4912 (2006)
17. Coombes, J.L., et al., 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*: 204(8), p. 1757-64 (2007)

18. Croft M: Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). *Annu Rev Immunol*: 28, 57-78 (2010)
19. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*: 10: 942–949 (2004)
20. Curotto de Lafaille M.A. et al., Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity*: 29(1), p. 114-26 (2008)
21. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*: 115: 3623–3633 (2005)
22. Darrasse-Jeze G, Deroubaix S, Mouquet H, Victora GD, Eisenreich T, Yao KH, Masilamani RF, Dustin ML, Rudensky A, Liu K, Nussenzweig MC. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 206:1853–1862 (2009)
23. Davis, M.M., T cell receptor gene diversity and selection. *Annu Rev Biochem.*: 59, p. 475-96 (1990)
24. Dawicki W, Watts TH: Expression and function of 4-1BB Turing CD4 versus CD8 T cell responses in vivo. *Eur J Immunol*: 34, 743-751 (2004)
25. Fei Duan, Yun Lin, Cailian Liu, Manuel E. Engelhorn, Adam D. Cohen, Michael Curran, Shimon Sakaguchi, Taha Merghoub, Stephanie Terzulli, Jedd D. Wolchok, and Alan N. Houghton, *Cancer Res*: 69(8), 3545–3553 (2009)
26. Dunn G.P., Koebel C.M., Schreiber R.D.: Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.*: 6, 836–848 (2006)
27. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D.: The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*: 21, 137-148 (2004)
28. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. Nov;3(11):991-8 (2002)
29. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*: 358 (25), 2704-2715 (2008)
30. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*: 4, 330–336 (2003)

31. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, Gajewski TF. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8 α ⁺ dendritic cells. *J Exp Med.*: 208, 2005–2016 (2011)
32. Galluzzi L., et al. Classification of current anticancer immunotherapies, *Oncotarget.*: 5 s. 12472-12508 (2014)
33. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*: 436, 1186–1190 (2005)
34. Gawlik N., Chodurek E., Orchel A., Kulczycka A., Dzierżewicz Z.: Rola immunoterapii w leczeniu chorych na czerniaka złośliwego. *Farm. Przegl. Nauk.*: 2, 33-38 (2011)
35. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*: 18(May (5)), 723–37 (1970)
36. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*: 202, 919–929 (2005)
37. Ghislin S., Obino D., Middendorp S., Boggetto N., Alcaide-Loridan C., Deshayes F.: Junctional adhesion molecules are required for melanoma cell lines transendothelial migration in vitro *Pigment Cell Melanoma Res.*: 24, 504-511 (2011)
38. Golgher D, Jones E, Powrie F, et al. Depletion of CD25⁺ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol*: 32, 3267–3275 (2002)
39. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W i Stokłosa T: *Immunologia*. PWN SA. Wyd. IV, Warszawa (2014)
40. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W: *Immunologia*. PWN SA. Wyd. IV, Warszawa (2005)
41. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*: 389(October (6652)), 737–42 (1997)
42. Guevara-Patino JA, Engelhorn ME, Turk MJ, et al. Optimization of a self antigen for presentation of multiple epitopes in cancer immunity. *J Clin Invest*: 116, 1382–1390 (2006)

43. Gupta S, Gupta Louis A: Tolerance and autoimmunity in primary immunodeficiency disease: a comprehensive review. *Clin Rev Allerg Immunol.* 45, 162-169 (2013)
44. Gurney AL, Marsters SA, Huang RM, Pitti RM, Mark DT, Baldwin DT, Gray AM, Dowd AD, Brush AD, Heldens AD et al.: Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr Biol.:* 9, 215-218 (1999)
45. Haass N.K., Herlyn M.: Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.:* 10, 153-163 (2005)
46. Hadeiba H, Lahl K, Edalati A, Oderup C, Habtezion A. et al: Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity:* 36, 438-450 (2012)
47. Haks, M.C., et al., Attenuation of gamma deltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alpha beta lineage. *Immunity:* 22(5), p. 595-606 (2005)
48. Hayes, S.M., L. Li, and P.E. Love, TCR signal strength influences alpha beta/gamma delta lineage fate. *Immunity:* 22(5): p. 583-93 (2005)
49. Hegazy, A.N., et al., Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity:* 32(1), p. 116-28 (2010)
50. Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defense against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. *British Journal of Cancer:* 33, 241–259 (1976)
51. Hodi FS i wsp. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.:* 363(13),1290 (2010)
52. Hodi FS. Well-defined melanoma antigens as progression markers for melanoma: insights into differential expression and host response based on stage. *Clin Cancer Res:* 12, 673-678 (2006)
53. Hori, S.; Nomura, T.; Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science:* 299, New York, p. 1057-1061 (2003)
54. Hori S, Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H: Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage

- and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*: 106, 1903-1908 (2009)
55. Jacek J. Sznurkowski, Janusz Emerich. Teoria immunoedycji – sieci immunosupresyjne w mikrośrodkowisku nowotworów. Nowe cele dla immunoterapii. *Curr. Gynecol. Oncol.*:7 (4), p. 282-287 (2009)
 56. Jenkins, M.K. and J.J. Moon, The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *Journal of immunology*: 188(9), p. 4135-40 (2012)
 57. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY: Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.*: 30, 531-564 (2012)
 58. Jun Mitsui, Hiroyoshi Nishikawa, Daisuke Muraoka, Linan Wang, Takuro Noguchi, Eiichi Sato, Satoshi Kondo, James P. Allison, Shimon Sakaguchi, Lloyd J. Old, Takuma Kato, and Hiroshi Shiku. Two Distinct Mechanisms of Augmented Antitumor Activity by Modulation of Immunostimulatory/Inhibitory Signals. *Clin Cancer Res.*: 16, 2781-279 (2010)
 59. Anz David, Wolfgang Mueller, Michaela Golic, Wolfgang G. Kunz, Moritz Rapp, Viktor H. Koelzer, Jonathan Ellermeier, Joachim W. Ellwart, Max Schnurr, Carole Bourquin,† and Stefan Endres. CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells *International Journal of Cancer*: 000, 000–000 (2011)
 60. Kanamaru F, Youngnak P, Hashiguchi M et al. Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. *J Immunol*: 172, 7306–7314 11 (2004)
 61. Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ: Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25SCD4+ precursors in a thymus independent process. *J Immunol*: 172, 923-928 (2004)
 62. Kim R., Emi M., Tanabe K.: Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*: 121, 1–14 (2007)
 63. Kim et al. 2015
 64. Kippenberger S., Loitsch S., Thaçi D., Müller J., Guschel M., Kaufmann R., Bernd A.: Restoration of E-cadherin sensitizes human melanoma cells for apoptosis. *Melanoma Res.*: 16, 393-403 (2006)

65. Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+CD8+ thymocytes. *Nature*, 742-746 (1988)
66. Klein G. The strange road to the tumor-specific transplantation antigens (TSTAs). *Cancer Immunol.*: 1, 6 (2001)
67. Ko K, Yamazaki S, Nakamura K et al. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3 + CD25+ CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med*: 202, 885–891 (2005)
68. 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. *Proc Natl Acad Sci USA*: 106, 1903-1908 (2009)
69. Korman AJ, Peggs KS, Allison JP. Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Adv Immunol.* 90:297-339 (2006)
70. Kosmaczewska Agata, Lidia Ciszak The Effect of the Blockade of Suppressor CTLA-4 Molecule on T Cell-Mediated Anti-Tumor Response. *Adv. Clin. Exp. Med.*: 13, 1, 125–130 (2004)
71. Lesiak K., Sztiller-Sikorska M., Czyż M.: Czynniki transkrypcyjne w powstawaniu i progresji czerniaka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*: 61, 576-595 (2007)
72. Li G., Satyamoorthy K., Herlyn M.: Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*: 13, 62-70 (2002)
73. Li, M.O., et al., Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology*: 24, p. 99-146 (2006)
74. Liu, V.C., et al., Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *Journal of immunology*: 178(5), p. 2883-92 (2007)
75. Long E, Wood KJ: Understanding FOXP3: progress towards achieving transplantation tolerance. *Transplant*: 84, 459-461 (2007)
76. Lu YC, Robbins PT. Targeting neoantigens for cancer immunotherapy. *Int Immunol* 2016;28 (7): 365-370
77. Marrack, P., et al., Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction. *Annual review of immunology*, 26: p. 171-203 (2008)

78. Masatsugu Oh-hora and Anjana Rao et al. 2009
79. Mazza, C. and B. Malissen, What guides MHC-restricted TCR recognition? *Seminars in immunology*, 19(4): p. 225-35 (2007)
80. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*;16(2):311-23 (2002)
81. Shevach EM, Stephens GL. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nature reviews immunology*;6(8):613-8 (2006)
82. Mittal Deepak, Matthew M Gubin, Robert D Schreiber, and Mark J Smyth: New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.*: 27, 16–25 (2014)
83. Murphy K, Travers P, Walport M. *Immunobiology*. Garland Science. 7th edition. 2008
84. Nakayamada, S., et al., Helper T cell diversity and plasticity. *Current opinion in immunology*, 24(3): p. 297-302 (2012)
85. Needham DJ, Lee JX, Beilharz MW. Intra-tumoural regulatory T cells: a potential new target in cancer immunotherapy. *Biochem Biophys Res Commun*: 343: 684–691 (2006)
86. Nishizuka, Y. and T. Sakakura, Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*: 166(906), p. 753-5 (1969)
87. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, Riccardi C: A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*: 94, 6216-6221 (1997)
88. Nocentini. *Therapeutic targets of the TNF Superfamily* (2009)
89. Nocentini G, Cari L, Migliorati G, et al. Treatment of autoimmune diseases and prevention of transplant rejection and graft-versus-host disease by regulatory T cells: The state of the art and perspectives. In: Zhang R, Tollefsbol T, editors. *The Epigenetics of Autoimmunity*: Academic press; p. 321-357 (2018)
90. Noman M.Z., Janji B., Kaminska B., Van Moer K., Pierson S., Przanowski P., Buart S., Berchem G., Romero P., Mami-Chouaib F., Chouaib S.: Blocking

- hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. *Cancer Res.*: 71, 5976-5986 (2011)
91. Oettinger, M.A., et al., RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*: 248(4962), p. 1517-23 (1990)
 92. Olbryt Magdalena: Rola mikrośrodowiska nowotworowego w powstaniu i progresji czerniaka skóry. *Postępy Hig. Med. Dośw.*: 67, 413-432 (2013)
 93. Orimo A., Weinberg R.A.: Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*: 5, 1597-1601 (2006)
 94. Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P, Ignatowicz L Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunity*: 25 (2), 249-259 (2006)
 95. Paluch Christopher, Santos Ana Mafalda, Anzilotti Consuelo, Richard J. Cornell, and Simon J. Davis Immune Checkpoints as Therapeutic Targets in Autoimmunity. *Front Immunol.* 9: 2306 (2018)
 96. Papiernik, M., et al., Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol.*: 10(4), p. 371-8 (1998)
 97. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol.*: 21, 807-839 (2003)
 98. Parmiani G. Melanoma antigens and their recognition by T-cells. *Keio J Med*: 50, 86-90 (2001)
 99. Pączek Leszek, Bartosz Foroniewicz. Tolerancja immunologiczna – wiodącym problemem transplantologii XXI wieku. *Borgis - Postępy Nauk Medycznych* s. 40-44, 1-2/ (2003)
 100. Petrausch U, Poehlein CH, Jensen SM, Twitty C, Thompson JA, Assmann I, Puri S, LaCelle MG, Moudgil T, Maston L, Friedman K, Church S, Cardenas E, Haley DP, Walker EB, Akporiaye E, Weinberg AD, Rosenheim S, Crocenzi TS, Hu HM, Curti BD, Urba WJ, Fox BA. Cancer immunotherapy: the role regulatory T cells play and what can be done to overcome their inhibitory effects. *Curr Mol Med.*: 9(6), 673-82 (2009)
 101. Placke Theresa, Hans-Georg Kopp, and Helmut Rainer Salih. Glucocorticoid-Induced TNFR-Related (GITR) Protein and Its Ligand in Antitumor Immunity: Functional Role and Therapeutic Modulation. *Clin Dev Immunol.* (2010)

102. Prasad SJ, Farrand KJ, Matthews SA, et al. Dendritic cells loaded with stressed tumor cells elicit long-lasting protective tumor immunity in mice depleted of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*: 174, 90–98. 106 (2005)
103. Puré E.: The road to integrative cancer therapies: emergence of a tumor-associated fibroblast protease as a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*: 13: 967-973 (2009)
104. Reinherz, E.L., et al., The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science*, 286(5446): p. 1913-21 (1999)
105. Rengarajan, J., S.J. Szabo, and L.H. Glimcher, Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today*: 21(10), p. 479-83 (2000)
106. Ronchetti, S., G. Nocentini, C. Riccardi, and P. P. Pandolfi. Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood*: 100, 350–352 (2002)
107. Rüter D., Bogenrieder T., Elder D., Herlyn M.: Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol.*: 3, 35-43 (2002)
108. Ryungsa Kim, Manabu Emi and Kazuaki Tanabe. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*: 121, (2007)
109. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunol*: 6: 345-352 (2005)
110. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*: 22, 531–62 (2004)
111. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*: 317(August (5838)), 627–9 (2007)
112. Sakaguchi, S., et al., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology*: 155(3), p. 1151-64 (1995)
113. Salama P., Platell C.: Colorectal cancer stem cells. *ANZ J. Surg.*: 79:697-702 (2009)
114. Schadendorf D i wsp. Immunotherapy of distant metastatic disease. *Ann Oncol*: 20, 41-50 (2009)
115. Schaer DA, Murphy JT, Wolchok JD. Modulation of GITR for cancer immunotherapy. *Current opinion in immunology*; 24(2):217-24 (2012)

116. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH: Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol.*: 3, 1-20 (2012)
117. Schmidt C. Melanoma vaccines: possible progress after years of frustration? *J Natl Cancer Inst*: 101, 140-141 (2009)
118. Schreiber Robert D, Lloyd J. Old, Mark J. Smyth. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*: vol. 331, Issue 6024, pp. 1565-1570 (2011)
119. Scirka B, Szurek E, Pietrzak M, Rempala G, Kisielow P, Ignatowicz L, Miazek M. Anti-GITR Antibody Treatment Increases TCR Repertoire Diversity of Regulatory but not Effector T Cells Engaged in the Immune Response Against B16 Melanoma. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2017
120. Sethi G., Shanmugam M.K., Ramachandran L., Kumar A.P., Tergaonkar V.: Multifaceted link between cancer and inflammation. *Biosci. Rep.*: 32, 1-15 (2012)
121. Setoguchi, R., et al., Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine*: 201(5), p. 723-35 (2005)
122. Shalev I, Schmelzle M, Robson SC, Levy G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin Immunol.* 2011 Aug;23(4):282-92
123. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. Apr 26;410(6832):1107-11 (2001)
124. Shao H., Cai L., Grichnik J.M., Livingstone A.S., Velazquez O.C., Liu Z.J.: Activation of Notch1 signaling in stromal fibroblasts inhibits melanoma growth by upregulating WISP-1. *Oncogene*: 30, 4316-4326 (2011)
125. Sharma S, Dominguez AL, Manrique SZ et al. Systemic targeting of CpG-ODN to the tumor microenvironment with anti neu-CpG hybrid molecule and T regulatory cell depletion induces memory responses in BALB-neu T tolerant mice. *Cancer Res.*: 68, 7530–7540 (2008)
126. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T et al. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*: 3, 135–142 (2002)

127. Sondak VK, Sabel MS, Mulé JJ. Allogeneic and autologous melanoma vaccines: where have we been and where are we going? *Clin Cancer Res*: 12, 2337-2341 (2006)
128. Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, et al. 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.*;173(8):5008-20 (2004)
129. Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, et al. 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.*;173(8):5008-20 (2004)
130. Lee Sun K., Beom K. Choi, Young H. Kim, Woo J. Kang, Kwang H. Kim, Shimon Sakaguchi, Jae H. Suh, Tae Y. Kim, Byoung S. Kwon. Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related receptor signalling exacerbates hapten-induced colitis by CD4+ T cells. *Immunology*: 119(4), 479–487 (2006)
131. Suri-Payer, E., et al., CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of immunology*: 160(3), p. 1212-8 (1998)
132. Suvas, S., et al., CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *The Journal of experimental medicine*: 198(6), p. 889-901 (2003)
133. Swain, S.L., et al., IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology*: 145(11), p. 3796-806 (1990)
134. Swatler Julian, Kozłowska Ewa. Immune checkpoint-targeted cancer immunotherapies, *Postepy Hig Med Dosw.*: 70, 25-42, (2016)
135. Szabo, S.J., et al., A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*: 100(6), p. 655-69 (2000)
136. Tang A., Eller M.S., Hara M., Yaar M., Hirohashi S., Gilchrist B.A.: E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J. Cell Sci.*: 107, 983-992 (1994)
137. Michele W.L. Teng, Jerome Galon, Wolf-Herman Fridman, and Mark J. Smyth. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest.*: 125(9), 3338-3346 (2015)

138. Thomas Sharyn, Hans J. Stauss and Emma C: Molecular immunology lessons from therapeutic T-cell receptor gene transfer. *Morris Immunology*, 129, 170–177 (2009)
139. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *Journal of immunology*: 164(1), p. 183-90 (2000)
140. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine*: 188(2), p. 287-96 (1998)
141. Turk MJ, Guevara-Patiño JA, Rizzuto GA et al. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med*: 200, 771–782 15 (2004)
142. **Vang KB, Yang J, Pagán AJ, Li LX, Wang J, Green JM, Beg AA, Farrar MA**. Cutting Edge: CD28 and c-Rel-Dependent Pathways Initiate Regulatory T Cell Development **J Immunol.**: 184(8), 4074-7 (2010)
143. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ: How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*: 8, 523-532 (2008)
144. von Boehmer H, Kisielow P. Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur? *Immunol Rev*. Feb; 209:284-9 (2006)
145. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nature immunology*: 8, 277–284 (2007)
146. Wing, K., Z. Fehervari, and S. Sakaguchi, Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol.*: 18(7), p. 991-1000 (2006)
147. Wojciechowska Urszula, Didkowska Joanna, Witold Zatoński. Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów. Warszawa (2009)
148. Wu X, Peng M, Huang B, Zhang H, Wang H, Xue Z, Zhang L, Da Y, Yang D, Yao Z, et al. Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett.*: 340, 124–133 (2013)

149. Chen Xin, Joost J. Oppenheim. Resolving the identity myth: Key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol.*: 11(10), 1489–1496 (2011)
150. Yang ZJ, Wechsler-Reya RJ. Hit 'Em Where They Live: Targeting the Cancer stem Cell Niche. *Cancer Cell*: 11, 3-5 (2007)
151. Yu P, Lee Y, Liu W, et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med*: 201, 779–791. 108 (2005)
152. Yuan J i wsp. Safety and immunogenicity of a human and mouse gp100 DNA vaccine in a phase I trial of patients with melanoma. *Cancer Immun*: 9 (5) (2009)
153. Zammaron BF, Chen WJ: Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci*: 7, 651-9 (2011)
154. Zheng, W. and R.A. Flavell, The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*: 89(4), p. 587-96 (1997)
155. Perona-Wright, G., K. Mohrs, and M. Mohrs, Sustained signaling by canonical helper T cell cytokines throughout the reactive lymph node. *Nature immunology*: 11(6), p. 520-6 (2010)
156. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez- Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA: Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol*: 10, 1000-1007 (2009)
157. Zhu Y, Tan Y, Ou R, Zhong Q, Zheng L, Du Y, Zhang Q, Huang J. Anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review of efficacy and safety in clinical trials. *Eur J Haematol.*: 96:389–96 (2016)
158. Żeromski J. red. *Immunopatologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa (2000)