

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
CATEDRA DE BIOLOGIE EXPERIMENTALĂ

MÉSZÁROS ILDIKÓ

**EXPRIMAREA UNOR GENE IMUNOMODULATOARE IMPLICATE ÎN
PATOLOGIA UMANĂ INFLAMATORIE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
ACAD. PROF. DR. OCTAVIAN POPESCU

CLUJ-NAPOCA
2010

CUPRINS

INTRODUCERE	2
I. ROLUL COSTIMULĂRII ÎN RĂSPUNSUL IMUN.....	4
<i>I.1. Genele cu rol de costimulare.....</i>	<i>10</i>
I.1.1. CD28.....	13
I.1.2. Antigenul pentru limfocitul T citotoxic (Cytotoxic T-Lymphocyte –associated antigen 4, CTLA-4, CD152)	18
I.1.3. Interleukina 2 (IL-2) și receptorul pentru interleukina 2 (IL-2R, CD25)	22
I.1.4. Factorul de necroză tumorală indusă de glucocorticoid (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR) și ligandul pentru GITR (GITRL)	28
I.1.5. Factorul de transformare și creștere B 1 (transforming growth factor beta 1, TGF Beta 1)	33
I.1.6. Interleukina 18 (IL18, factor de inducere a interferonului γ).....	42
I.2. Receptorii citokinelor și calea lor de semnalizare	45
I.3. Limfocitele reglatoare	48
II.MATERIALE ȘI METODE.....	53
II.1 Analiza ARNm	53
II.1.1. Prelevarea materialului biologic.....	53
II.1.2. Procesarea probelor biologice	53
II.1.3. Extracția ARN total	55
II.1.4. Transcrierea inversă a ARN (RT-PCR).....	57
II.1.5. PCR specific genelor.....	60
II.2. Prelucrarea gelurilor și analiza statistica a datelor.....	75
III. CONTRIBUȚII PERSONALE, REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	76
III.1. Profilul de exprimare al genelor costimulatoare la lotul control, în patologii inflamatorii și în neoplazii.....	76
III.1.1. Profilul de exprimare al genelor la lotul control	76
III.1.2. Profilul de exprimare al genelor în amigdalita acută	77
III.1.3. Profilul de exprimare al genelor în poliartrita reumatoidă	80
III.1.4. Profilul de exprimare al genelor în lupus eritematos sistemic	82
III.1.5. Profilul de exprimare al genelor în cancerul mamar	86
III.1.6. Profilul de exprimare al genelor în cancerul bronhopulmonar.....	88
III.2. Exprimarea genelor costimulatoare la lotul control, în patologii inflamatorii și în neoplazii.....	91
III.2.1. Exprimarea ARNm CD25	91
III.2.2. Exprimarea ARNm IL-2.....	92
III.2.3. Exprimarea ARNm CD28	93
III.2.4. Exprimarea ARNm TGF β 1	94
III.2.5. Exprimarea ARNm CTLA-4	96
III.2.6. Exprimarea ARNm GITRL	99
III.2.7. Exprimarea ARNm GITR.....	101
III.2.8. Exprimarea ARNm IL-18.....	103
IV. CONCLUZII	106
V. BIBLIOGRAFIE	110
VI. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE DE DOCTORAND LEGATE DE SUBIECTUL TEZEI DE DOCTORAT	126
VII. ANEXE	127

Cuvinte cheie: imunomodulator, gene costimulatoare, exprimarea ARNm, inflamații, neoplazie, *TGF β 1*, *GITR*, *GITRL*, *CD28*, *CTLA-4*, *IL-2*, *IL-2R α* (*CD25*), *IL-18*.

INTRODUCERE

Inflamația este răspunsul natural al organismului împotriva unor agenți patogeni externi sau factori interni. Răspunsul imun înăscut și cel specific, adaptativ sunt procese complexe în care sunt implicate o serie de celule cu receptori specifici și liganzii, lor prin care se realizează comunicarea inter-și intracelulară. Totalitatea acestor semnale care iau naștere în urma “cross-talk”-ului între receptorii de pe aceeași celulă și diferite celule implicate, determină dacă se declanșează răspunsul imun, localizarea, tipul, durata și intensitatea răspunsului imun, sau dacă celula rămâne indiferentă față de antigen și intră în anergie (Clark R., 2005). Modelul clasic explică activarea limfocitelor prin modelul celor două semnale, dintre care semnalul primar determină specificitatea față de antigen, iar cel de al doilea semnal, semnalul de costimulare determină tipul, intensitatea și durata răspunsului imun. Astfel, primul semnal rezultă în urma prezentării antigenului prin complexul MHC al APC către sistemul TCR al limfocitului T, sistem format din TCR, coreceptorii CD4 sau CD8 și CD3. Cel de al doilea semnal este dat de interacțiunea între receptorii de costimulare B7.1 (CD80) și B7.2 (CD86) exprimate pe APC și receptorul CD28 al limfocitului T cu rol de costimulator pozitiv. Paralel cu exprimarea CD28 se exprimă CTLA-4 (CD152), care este receptorul alternativ pentru B7.1 (CD80) și B7.2 (CD86) cu rol de costimulare negativă. O serie de alte gene considerate imunomodulatoare conțin în promotorul lor elemente CD28 inductibile, cum sunt IL-2R α , IL-2 (Ermann J., Fathmann C.G., 2003).

În urma descoperirii altor receptori de costimulare, de exemplu celor din familia receptorilor factorilor de necroză tumorală TNF (ex. *GITR*, *OX40*, *4-1BB*) s-a dovedit că reglarea imună este un proces mult mai complex.

Cercetările recente arată importanța limfocitelor reglatoare Treg CD4⁺CD25⁺ și a celor CD8⁺CD25⁺ în reglarea fină a răspunsului imun, la care, pe lângă APC și limfocitele T convenționale, responder (CD4⁺CD25⁻), participă și limfocitele T reglatoare (Beissert S., 2006, Stephens G. L., 2004).

Limfocitele participante în acest dialog (APC, T responder, Treg) necesită un anumit micromediu dat de prezența anumitor citokine specifice (IL-2, TGF β 1, IL-6, IL-10 etc.) (Stephens G. L., 2004).

Prin receptorii de imunomodulare, celulele intră într-un dialog de costimulare, se transmit semnale în cele două direcții iar totalitatea acestor semnale decide dacă limfocitul ia calea activării, diferențierii, proliferării, transformării în limfocit efector, de memorie sau dacă celula intră în anergie sau apoptoză (Rudiger A. ,2006, Bae E.M, 2008). În acest fel s-a conturat o ierarhie al combinațiilor dintre receptorii de costimulare și liganzii lor implicate în “fine-tuning”, reglarea fină al răspunsului imun.

În lucrarea de față s-a propus studierea exprimării ARNm al unor gene imunomodulatoare în sisteme celulare umane ex-vivo pentru a obține profilul de exprimare în patologia inflamatorie. Pentru a obține profilul de exprimare s-a urmărit numărul probelor pozitive pentru genele luate în studiu și cantitatea relativă de exprimare a genelor. Cantitățile relative exprimate pentru genele studiate în inflamații au fost interpretate în comparație cu cantitățile relative exprimate la lotul martor.

Astfel pentru obținerea profilului de exprimare al ARNm s-a realizat PCR semicantitativ pentru genele *TGF β 1* (*Transforming growth factor beta 1*) (NM_00066019), *GITR* (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) (NM_148902), *GITRL* (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand*) (NM_005092), *CD28* (NM_006139), *CTLA-4* (*Cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4*) (NM_005214), *IL-2R α* (*CD25*) (*Interleukin 2 receptor, alpha*) (NM_000417), de asemenea genele unor citokine ca: *IL-2* (*Interleukin 2*) (NM_000586), *IL-18* (*Interleukin 18, interferon-gamma-inducing factor*)(NM_001562)(NCBI accession numbers -www.genenames.org).

I. ROLUL COSTIMULĂRII ÎN RĂSPUNSUL IMUN

I.1. GENELE CU ROL DE COSTIMULARE

CD28 are rol în costimularea pozitivă ale limfocitelor T contrar *CTLA-4* care are efect de costimulare negativă. Anti-GITR este sinergic în costimularea cu anti-CD28 (Kanamaru F. și colab., 2004). *CTLA-4* este exprimat în cantități reduse pe limfocitele T naive, și este suprareglat prin activarea limfocitelor T. Mao H. și colab. au observat supraexprimarea proteinei și a ARNm

CTLA-4 în țesutul tumoral mamar și în limfocitele periferice ale pacienților cu cancer mamar (Mao H și colab. 2005).

O serie de grupuri au evidențiat suprareglarea *CTLA-4* în bolile autoimune (Westerholm-O.M. și colab., 2010).

Prin reglarea exprimării acestor molecule costimulatoare se creează homeostaza bazală a sistemului imun.

Thornton a demonstrat că în model murin *ARNm IL-2 mRNA* nu este exprimat de limfocitele Treg $CD4^+CD25^+$ stimulate sau nestimulate. Limfocitele $CD4^+CD25^-$ stimulate cu anti-CD3 supraexprimă *ARNm IL-2* contrar limfocitelor $CD4^+CD25^-$ nestimulate. Cu toate că CD25 este exprimat constitutiv pe limfocitele $CD4^+CD25^+$, aceste celule nu proliferază în prezența *IL-2* când sunt stimulate cu anti-CD3 sau anti-CD28. *IL-2* și CD28 sunt markeri de activare al limfocitelor.

Conform lui Thornton și Shevach limfocitele Treg, $CD4^+CD25^+$ inhibă limfocitele $CD4^+CD25^-$ prin blocarea transcrierii ARN *IL-2* al acestor celule (Thornton A.M., 1998).

GITR uman este suprareglat prin activarea limfocitelor T $CD4^+CD25^-$ T (Kwon B.S. și colab., 1999, Tuyaerts S. și colab., 2007). În model murin *GITR* este indus de glucocorticoizi sau prin activarea limfocitelor (Nocentini G., și colab., 1997) pe când în model uman *GITR* este suprareglat doar prin activarea limfocitelor T responder.

GITR este exprimat constitutiv pe limfocitele Treg, $CD4^+CD25^+$, iar depletarea *GITR* sau legarea cu anticorpi duce la apariția unor boli autoimune (Shimizu J., și colab., 2002).

GITRL este exprimat pe celulele prezentatoare de antigen, pe celule endoteliale, dar nu se exprimă pe limfocitele T. Ronchetti și colab. au dovedit că stimularea *GITR* are rol cheie pentru costimularea limfocitelor $CD8^+$ pentru că aceste limfocite pot fi stimulate doar cu *GITR* chiar în absența CD28 (Ronchetti S. și colab., 2007).

TGF β1 în funcție de condiții poate avea efect imunostimulator sau imunosupresor asupra limfocitelor T (Zhang X., 2002). *TGF β1* secretat de limfocitele Th3 poate costimula celulele $CD8^+$ sau poate inhiba exprimarea *IL-2Rα* (*CD25*), care inhibă proliferarea limfocitelor T. Creșterea cantității *TGF β1* poate fi asociat cu stările canceroase avansate (Łuczyński W. și colab., 2010), (Sato Y. și colab., 2010).

Interleukina 18 (*IL-18*) este o citokină proinflamatoare, care împreună cu alte citokine și chemokine contribuie la micromediul specific tumorilor sau a inflamațiilor.

Există date controversate legat de rolul *IL-18* în cancer. Unii autori descriu efectul pro-neoplazic al *IL-18* în diferite cancere. Creșterea nivelului seric al *IL-18* la pacienți neoplazici poate fi corelat cu malignitatea tumorii.

Jung și colab. au demonstrat creșterea interleukinelor inflamatorii *IL-15*, *IL-17*, *IL-18* și a proteinelor de legare pentru ele în țesutul tumoral (Jung M.Y. și colab., 2009).

Park și colab. au demonstrat că în linia celulară MCF-7 de cancer mamar crește nivelul *IL-18* (Park S. și colab., 2009).

II. MATERIALE ȘI METODE

Modelul experimental:

Pentru realizarea profilului de exprimare s-a elaborat o metodă bazată pe PCR semicantitativ a unor probe provenind de la pacienți cu inflamație acută, cu inflamație cronică, neoplazie și respectiv controale. În acest scop s-au recoltat probe de sânge de la 19 voluntari reprezentând lotul control, probe de țesut amigdalian de la 42 pacienți pentru inflamația cronică. De asemenea, s-au recoltat probe de sânge de la 8 pacienți cu poliartrită reumatoidă și 4 pacienți cu lupus eritematos sistemic, utilizate pentru modelul de inflamație cronică. Similar, în neoplazie s-a lucrat cu 10 tumori mamare și 2 probe de sânge de la pacienți cu tumore mamară, precum și sângele periferic de la 4 pacienți cu tumoare bronho-pulmonară.

II.1. Analiza ARNm:

Din sângele periferic integral s-au separat limfocitele totale, iar din țesut s-a folosit infiltratul de țesut care au fost stocate la -85 grade C până în momentul extracției ARN. Pentru extracția ARN în toate cazurile s-a pornit de la aceeași număr de celule, de la 10×10^6 celule. Extracția ARN total s-a realizat cu reactivul *Trizol*[®] *LS Reagent* (Invitrogen) conform protocolului de lucru propus de firma producătoare. Concentrația ARN-ului obținut s-a determinat prin măsurători de spectrofotometrie UV/VIS (*Varian Carry*) la 260 nm, iar pentru determinarea purității ARN-ului obținut s-a calculat raportul A_{260}/A_{280} . Pentru a confirma prezența și calitatea ARN-ului extras s-a procedat la electroforeza ARN în gel de agaroză vizualizat cu bromură de etidiu. S-au folosit cantități egale de ARN pentru transcripția inversă în ADNc la care s-a utilizat *iScript*[™] *cDNA Synthesis Kit* (BioRad). ADNc astfel obținut a fost utilizat pentru PCR specific genelor studiate. La proiectarea amorselor s-a ținut cont de excluderea posibilității amplificării ADN-ului genomic și de evidențierea variantelor ARNm. S-a efectuat optimizarea PCR pentru fiecare amorsă astfel ca produsul de amplificare să fie specific și pentru ca rezultatele să fie interpretabile

semicantitativ. În prima etapă a optimizării s-a determinat temperatura optimă de hibridare a amorsoanelor pentru a obține ampliconul specific. În a doua etapă a optimizării PCR s-a recurs la PCR dependent de doză, când s-a determinat numărul optim de cicluri la care amplificarea se află în faza logaritmică. Aceasta permite analiza semi-cantitativă a ampliconilor, comparația lor cu lotul control iar rezultatele obținute sunt valori relative ale intensităților.

S-au utilizat următoarele amorse: TGFβ₁ 5'- GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC T -3' și 5'- AGG CTC CAA ATG TAG GGG CAG G-3'; IL-2 5'- GCT ACA ACT GGA GCA TTT ACT GCT G -3' și 5'- CTA CAA TGG TTG CTG TCT CAT CAG C-3'; IL-2Rα 5'- GAT GGA TTC ATA CCT GCT GAT GTG G -3' și 5'- TCC ACT GGC TGC ATT GGA CTT TGC A -3'; GITR: 5'- TTG GAA CAA GAC CCA CAA CG -3' și 5'- GGC ACC TCC AGC AGC AGC T -3'; GITRL 5'- CTT TAA GCC ATT CAA GAA CTC A -3' și 5'- CCC AAC ATG CAA TTC ATA AGT CC-3'; 5'- ATG CTC AGG CTG CTC TTG GCT -3' și 5'- TCA GGA GCG ATA GGC TGC GA -3'; CTLA-4: 5'- CTT CTC TTC ATC CCT GTC TTC TGC -3' și 5'-ATT GCT TTT CAC ATT CTG GCT CTG-3'; IL-18: 5'- GCT TGA ATC TAA ATT ATC AGT C -3' și 5'- GAA GAT TCA AAT TGC ATC TTA -3'; Producții de amplificare au fost separați în gel de agaroză de 1,5% și vizualizați în UV în prezența bromurii de etidiu. Pentru controlul intern al PCR s-a folosit gena housekeeping GAPDH NC_000012.10. Normalizarea s-a realizat în funcție de exprimarea genei GAPDH.

II.2. Prelucrarea gelurilor și analiza statistică a datelor

Cuantificarea produșilor de amplificare s-a realizat prin metoda analizei volumetrică, utilizând programul *Quantity One* (BioRad.), iar la prelucrarea datelor s-au folosit programele Excel și Matlab.

Utilizând acest program s-a extras "background"-ul pentru fiecare gel în parte și s-a determinat intensitatea relativă pentru fiecare bandă obținută. După aceasta, s-a realizat normalizarea datelor în funcție de exprimarea genei GAPDH. Prezentarea grafică s-a realizat cu ajutorul programului Matlab, metoda notched box plot. Fiecare coloană de date are o valoare minimă, mediană și o valoare maximă.

Pentru controlul comparației s-a utilizat testul Student. Diferențele au fost considerate statistic semnificative pentru $P < 0,05$.

III. CONTRIBUȚII PERSONALE, REZULTATE ȘI DISCUȚII

III.1. Profilul de exprimare al genelor costimulatoare la lotul control, în patologii inflamatorii și în neoplazii

III.1.1. Profilul de exprimare al genelor la lotul control

La lotul control peste 60% din cazuri exprimă *TGF B1* așa cum se poate observa și în Fig 1. *GITR* este exprimat în puține cazuri (3 din 19), însă cantitatea relativă exprimată este importantă (Fig 2). *Ligandul GITR* apare doar la un singur caz (n=19). Apariția *GITR* și a *GITRL* în cantități relativ importante la control se poate explica prin faptul că controlul ales, deși era sănătos clinic în momentul prelevării sângelui, nu am avut informații legate de antecedentele sale imunologice. În cazul lotului control genele imunostimulatoare *CD25*, *IL-2*, *IL-18*, *CD28* se exprimă în puține cazuri (5 cazuri pentru *CD25*, 3 cazuri pentru *IL-2*, 3 cazuri pentru *CD28* și 8 cazuri pentru *IL-18*, dintr-un număr total de 19 subiecți control) prezentate în Fig 2. La fel este și în cazul variantelor 1 și 2 *CTLA-4* (3 cazuri).

Deci, pentru lotul control, profilul de exprimare este dat în primul rând de exprimarea *TGFB1*, *CD25* și *IL-18* și exprimarea redusă a *GITR*, *GITRL*, *IL-2*, *CD28*, *CTLA-4 var1* și *CTLA-4 var2*.

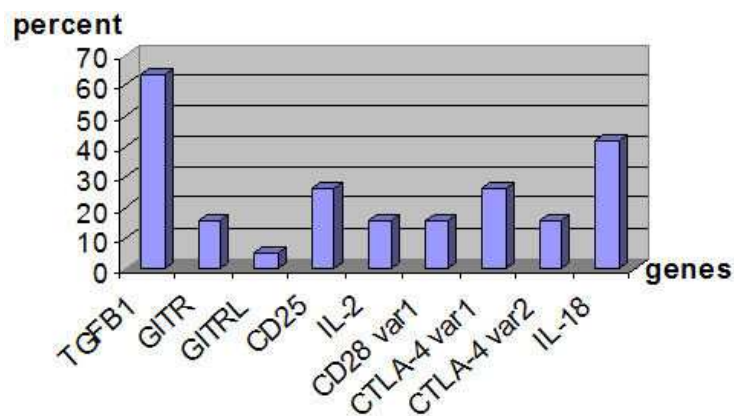


Fig 1. Exprimarea genelor imunomodulatoare în limfocitele periferice la lotul control (procentul cazurilor pozitive)

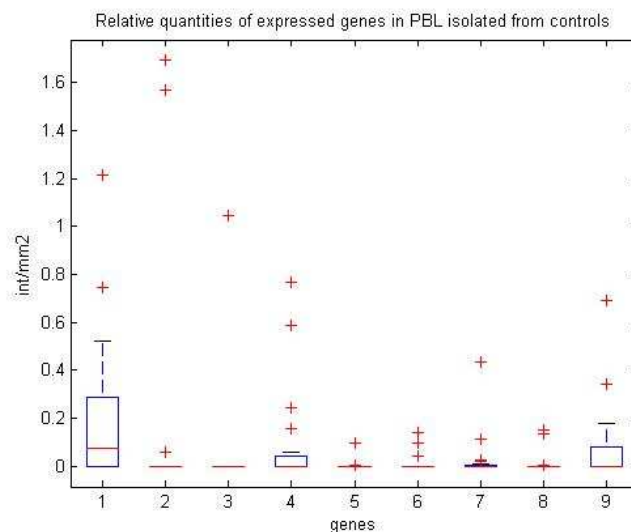


Fig 2. Cantitatea relativă exprimată a genelor imunomodulatoare în limfocitele periferice la lotul control (1. *TGF β1*, 2. *GITR*, 3. *GITRL*, 4. *CD25*, 5. *IL-2*, 6. *CD28 var1*, 7. *CTLA-4 var1*, 8. *CTLA-4 var2*, 9. *IL-18*).

Astfel, se poate observa exprimarea redusă a genelor costimulatoare caracteristice atât pentru Treg (*GITR*, *GITRL*, *CTLA-4 var1* și *CTLA-4 var2*), cât și pentru limfocitele activate (*IL-2*, *CD28*).

Profilul de exprimare al genelor costimulatoare din limfocitele periferice ale lotului control ne arată linia de bază, modelul conform căruia se realizează homeostazia în condițiile neexistenței unei inflamații.

III.1.2. Profilul de exprimare al genelor în amigdalita acută

Analiza gelurilor de electroforeză pentru genele studiate în amigdalita acută și la lotul control arată o supraexprimare a genelor în inflamația acută, după cum este prezentat în Fig 3.

În modelul nostru de inflamație acută, în amigdalita acută am observat că genele studiate se exprimă în majoritatea cazurilor (peste 80% din cazuri) (Fig 4), mai puțin *GITRL*, care se exprimă în 47% dintre cazuri.

Cantitățile relative exprimate sunt însemnate, așa cum se poate observa în Fig 4. Din punct de vedere al exprimării genice relative, exprimarea *TGF B1* în amigdalita acută este ridicată în comparație cu lotul control. *GITR* se exprimă în majoritatea cazurilor (95%). *CD25*, *CD28*, *IL-2*, *IL-18* și *GITRL* se supraexprimă comparativ cu lotul martor ($P < 0,05$) așa cum se poate vedea în imaginile gelurilor obținute (Fig 3). De asemenea, *variantele 1 și 2 CTLA-4* arată exprimare mai pronunțată (peste 90% din cazuri, $n=19$, $P < 0,05$) comparativ cu lotul martor.

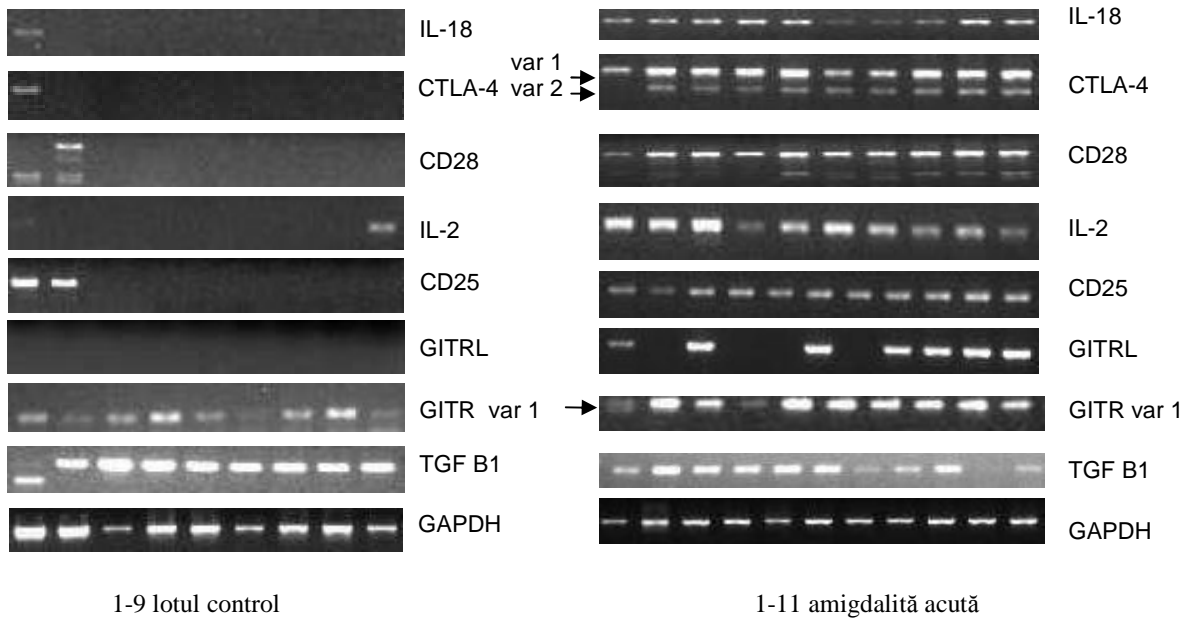


Fig 3. Analiza PCR al exprimării ARNm la lotul control și la pacienții cu amigdalită acută. Producții PCR au fost separați prin electroforeză în gel de agaroză de 1,5%

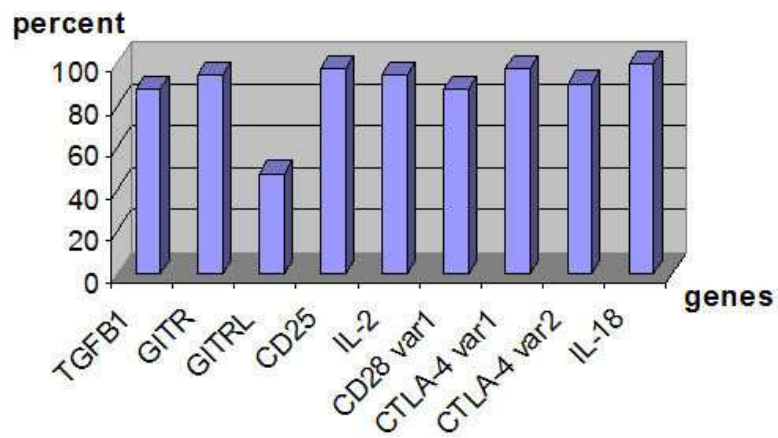


Fig 4. Cantitatea relativă exprimată a genelor din infiltratul de țesut în amigdalită acută control

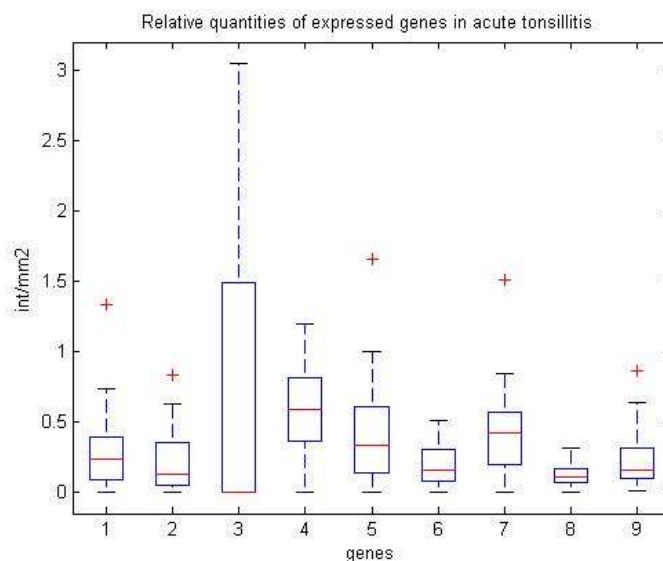


Fig 5. Cantitatea relativă exprimată a genelor din infiltratul de țesut în amigdalită acută control (1. *TGF β1*, 2. *GITR*, 3. *GITRL*, 4. *CD25*, 5. *IL-2*, 6. *CD28 var1*, 7. *CTLA-4 var1*, 8. *CTLA-4 var2*, 9. *IL-18*).

În comparație cu inflamațiile cronice, genele *IL-2* și *CD28* sunt supraexprimate; *CD25*, *TGF β1*, *GITR* și *IL-18* sunt subexprimate, iar *CTLA-4* și *GITRL* sunt exprimate similar.

Genele *IL-2* și *CD28* sunt gene caracteristice limfocitelor T activate, iar supraexprimarea acestor gene în amigdalită acută arată prezența limfocitelor activate în țesutul amigdalian inflammat. Exprimarea pronunțată a genelor *CD25*, *GITR* și *CTLA-4* arată prezența unor limfocite Treg în țesutul amigdalian inflammat, dar în cantitate mai redusă față de inflamațiile cronice.

III.1.3. Profilul de exprimare al genelor în artrita reumatoidă

În poliartrita reumatoidă genele studiate de noi se exprimă în majoritatea cazurilor luate în studiu. Excepție sunt *GITRL*, care se exprimă la 50% din cazuri (4 din n=8) și *IL-2*, care nu se exprimă la nici un caz (Fig 6). S-a observat că genele *TGFβ1*, *GITRL*, *CD25*, *CD28 var1*, *CTLA-4 var 1* și *CTLA-4 var 2* și *IL-18* se exprimă în cantități relativ ridicate așa cum se arată și în Fig 7. În comparație cu lotul control, genele *GITR*, *GITRL*, *CD25*, *CD28 var1*, *CTLA-4 var 1* și 2 și *IL-18* se supraexprimă ($P < 0,05$). Comparativ cu inflamația acută, diferența semnificativă este dată de *IL-2*, care nu se exprimă în inflamația cronică dar se exprimă în inflamația acută.

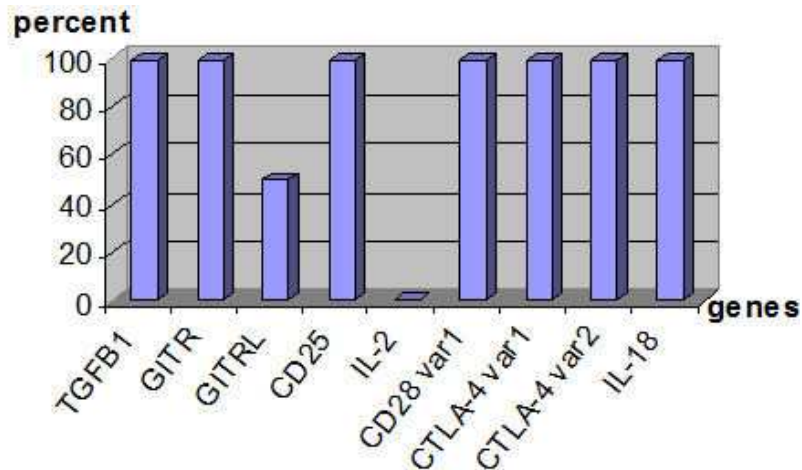


Fig 6. Procentul probelor pozitive pentru genele imunomodulatoare în artrită reumatoidă

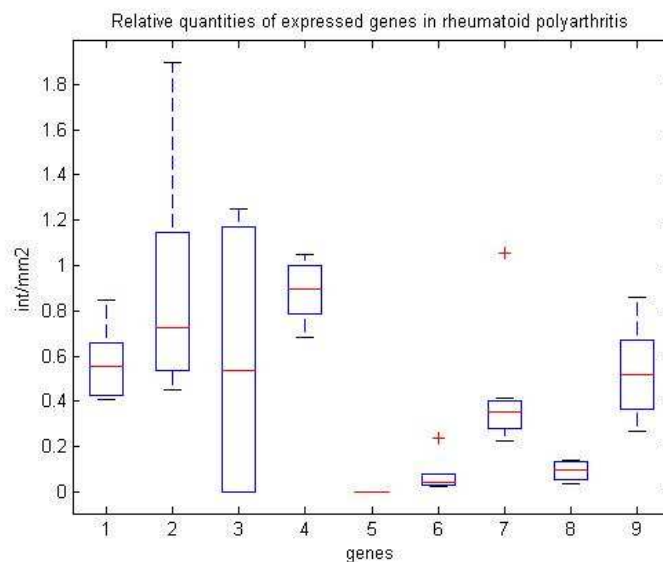


Fig 7. Cantitatea relativă exprimată a genelor din limfocitele sanguine periferice în artrită reumatoidă (1. *TGF β1* , 2. *GITR*, 3. *GITRL*, 4. *CD25*, 5. *IL-2*, 6. *CD28 var1*, 7. *CTLA-4 var1*, 8. *CTLA-4 var2*, 9. *IL-18*).

III.1.4. Profilul de exprimare al genelor in lupus eritematos sistemic

Profilul de exprimare obținut pentru lupusul eritematos sistemic este asemănător cu cel găsit în poliartrita reumatoidă.

În mod asemănător celor observate în amigdalita acută și în poliartrita reumatoidă, majoritatea genelor studiate de noi se exprimă în toate cazurile, așa cum este prezentat în Fig 8. Excepție este *GITRL*, care se exprimă doar la jumătate din cazuri (2 din 4). *IL-2* se exprimă doar la puține

cazuri (1 din 4 cazuri). Așadar, lupusul eritematos sistemic și poliartrita reumatoidă diferă de inflamația acută prin exprimarea joasă a *IL-2*, iar față de lotul control prin supraexprimarea tuturor genelor.

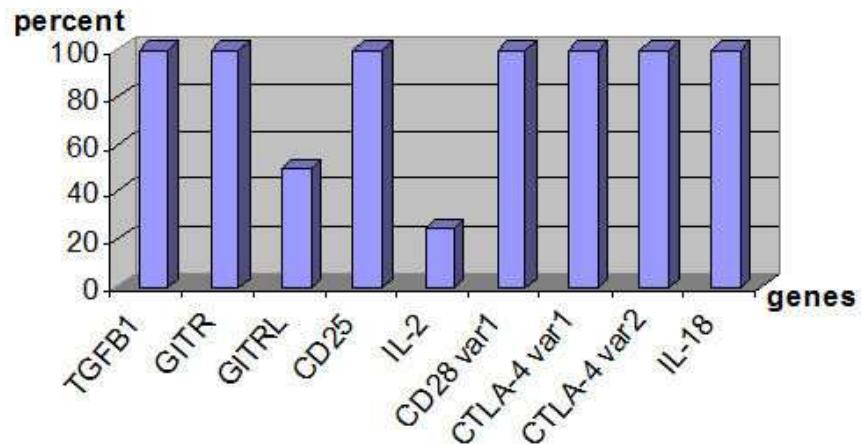


Fig 8. Procentul cazurilor pozitive ale unor gene imunomodulatoare din limfocitele sanguine periferice în lupus eritematos sistemic

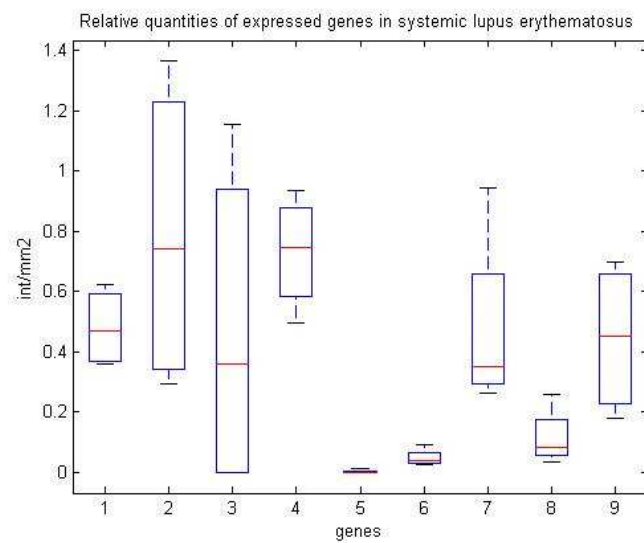


Fig 9. Procentul cazurilor pozitive ale unor gene imunomodulatoare din limfocitele sanguine periferice în lupus eritematos sistemic (1. *TGF β1*, 2. *GITR*, 3. *GITRL*, 4. *CD25*, 5. *IL-2*, 6. *CD28 var1*, 7. *CTLA-4 var1*, 8. *CTLA-4 var2*, 9. *IL-18*).

În ceea ce privește cantitățile relative exprimate ale genelor este de remarcat lipsa IL-2, și supraexprimarea *TGF β1*, *GITR*, *GITRL*, *CD25*, *CTLA var1* și *var2* și *IL-18* Fig 9.

Poliartrita reumatoidă este o boală inflamatorie autoimună sistemică, cauzată de controlul ineficient al celulelor T autoreactive CD4+CD28+Th1 (Th1) sau al limfocitelor B producătoare de anticorpi, de către limfocitele T reglatoare CD4+CD25+ (Tr) și de limfocitele T supresoare CD8+CD28- (Ts) (Xue H, și colab,2010). Unii autori au identificat în sângele și în lichidul sinovial al pacienților cu AR limfocite T reglatoare cu funcție schimbată .

Lupusul eritematos este o boală autoimună sistemică cauzată de producția de autoanticorpi împotriva antigenilor nucleari, ca urmare a unor limfocite B hiperactive. De asemenea, în LES limfocitele T efectoare pot avea fenotip hiperactiv (Jury EC. și colab.2010).

Am demonstrat suprareglarea ARNm *GITR*, *GITRL*, *CD25*, *TGF β1*, *CTLA-4* în limfocitele periferice ale pacienților cu artrită reumatoidă și lupus eritematos sistemic. Genele *CD28* și *IL-2* sunt subexprimate la acești pacienți.

Toate genele supraexprimate sunt cele caracteristice limfocitelor Treg, însă dat fiind faptul că IL-2 necesară activării limfocitelor este subexprimată, poate indica faptul că limfocitele Treg nu sunt funcționale, sunt anergice, ceea ce explică cronicizarea inflamației.

De asemenea, am demonstrat că profilurile de exprimare ale genelor costimulatoare studiate în artrită reumatoidă și lupusul eritematos sistemic sunt similare ($p > 0.05$) între ele și caracteristice inflamației cronice, diferă de profilurile obținute în inflamația acută sau în cancer, ceea ce ajută la diferențierea între diferitele tipuri de inflamații.

III.1.5. Profilul de exprimare al genelor în cancerul mamar

În neoplazie, în tumora mamară *TGF B1*, *GITR* și *CD25* se exprimă în majoritatea cazurilor, pe când genele *GITRL* în 2 din 10 cazuri, *IL-2* în 1 din 10 cazuri, *CD 28 var1* în 3 din 10 cazuri, și *variantele 1 și 2 CTLA-4* se exprimă în puține cazuri (1 din 10 cazuri) (Fig 10).

În ceea ce privește cantitățile relative exprimate (Fig 11), cantitatea relativă a *TGF B1* este asemănătoare cu lotul martor, dar mai redusă față de cea din amigdalită acută, artrită reumatoidă și lupus eritematos sistemic. Pentru a exclude eventualele erori date de faptul că la tumora mamară am lucrat cu probe de țesut, iar la lotul control cu sânge periferic, am procedat la colectarea de sânge periferic de la pacienții cu tumoră mamară și am comparat exprimarea

genelor studiate din țesut, respectiv sânge de la acești pacienți. Diferențele găsite între cele două tipuri de probe biologice nu sunt semnificative.

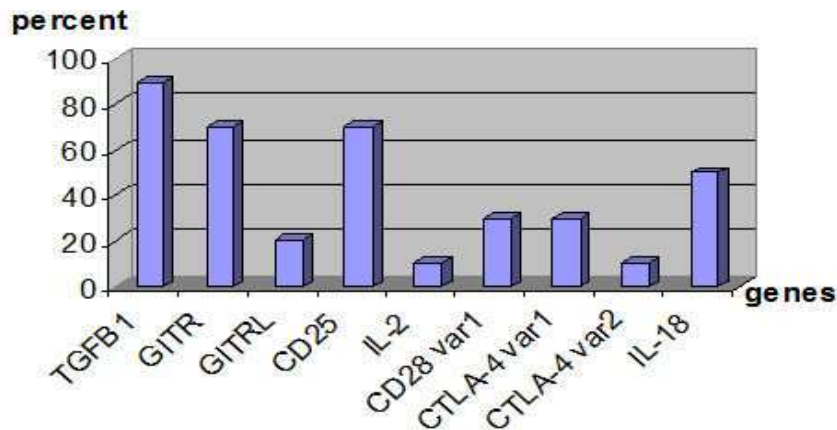


Fig 10. Procentul cazurilor pozitive pentru gene imunomodulatoare din infiltratul de tumoră mamară

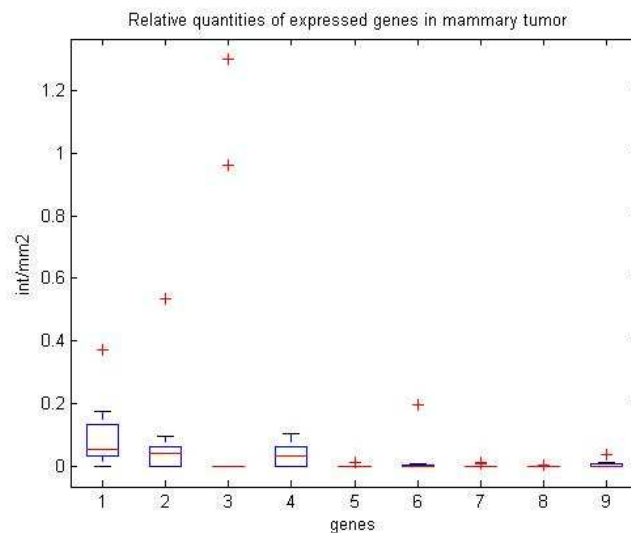


Fig 11. Cantitățile relative exprimate ale unor gene imunomodulatoare din infiltratul de tumoră mamară (1. *TGF β1*, 2. *GITR*, 3. *GITRL*, 4. *CD25*, 5. *IL-2*, 6. *CD28 var1*, 7. *CTLA-4 var1*, 8. *CTLA-4 var2*, 9. *IL-18*).

III.1.6. Profilul de exprimare al genelor în cancerul bronhopulmonar

În tumorile pulmonare *GITRL*, *IL-2* și variantele *CTLA-4* se exprimă în puține cazuri cum este prezentat pe figura 12. Cantitățile relative exprimate sunt mici pentru majoritatea genelor (Fig 13), sunt puțin mai mari pentru *GITRL*, *CD25*, *IL-2* și *IL-18*. Cantitățile relative ale genelor studiate sunt mai mici față de lotul control și față de restul patologilor.

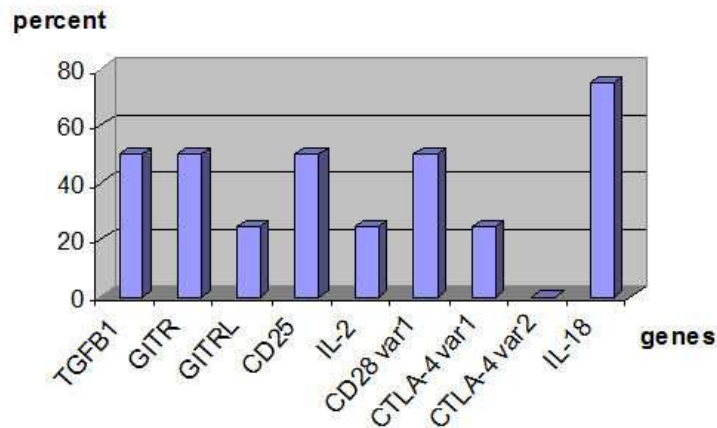


Fig 12. Procentul probelor pozitive pentru gene imunomodulatoare în cancerul bronhopulmonar

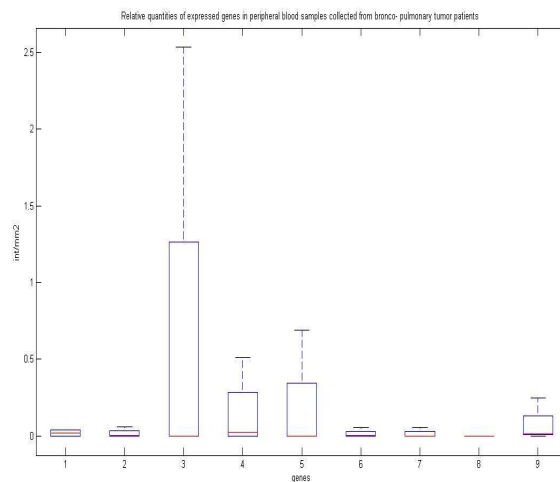


Fig 13. Intensitățile relative ale unor gene imunomodulatoare în tumorile bronhopulmonare (1. *TGF β1*, 2. *GITR*, 3. *GITRL*, 4. *CD25*, 5. *IL-2*, 6. *CD28 var1*, 7. *CTLA-4 var1*, 8. *CTLA-4 var2*, 9. *IL-18*).

Prin metoda DNA microarray, Zhang X. și colab, (Zhang X. și colab., 2002) au observat că în limfocitele murine T, activate, tumor specifice sunt exprimate peste 100 de gene, pe când limfocitele T naive exprimă 37 de gene. Printre cele suprareglate în limfocitele murine T, activate se numără și *TGF β*, *CD25*, *4-1BB*, *GITR*, *CD28*, *CTLA-4*, *OX40*.

Markerii fenotipici pentru Treg sunt *CD25*, *CTLA-4* și *GITR*, care se exprimă constitutiv pe aceste celule.

Datele noastre arată subexprimarea tuturor genelor costimulatoare studiate față de inflamații, atât față de inflamația acută, cât și față de cea cronică.

În comparație cu lotul control, se poate observa că *IL-2* și *CTLA-4* nu se exprimă (asemănător lotului control), intensitățile relative pentru *TGF β1* și *IL-18* sunt similare, iar *CD25*, *CD28*, *GITR* și *GITRL* sunt supraexprimate.

Supraexprimarea *CD25*, *CD28*, *GITR* arată prezența limfocitelor Treg în țesutul tumoral într-un număr mai mare față de control. Aceste celule Treg contribuie la supresia imună antitumorală. În mod asemănător *GITRL* și *TGF β1* contribuie la toleranța imună a celulelor tumorale.

III.2.Exprimarea genelor costimulatoare la lotul control, în patologii inflamatorii și în neoplazii

III.2.1. Exprimarea ARNm CD25

Analiza intensităților relative arată supraexprimarea *CD25* în inflamația cronică și acută, în contrast cu probele de neoplazie și lotul martor, așa cum sunt prezentate și în Fig 14.

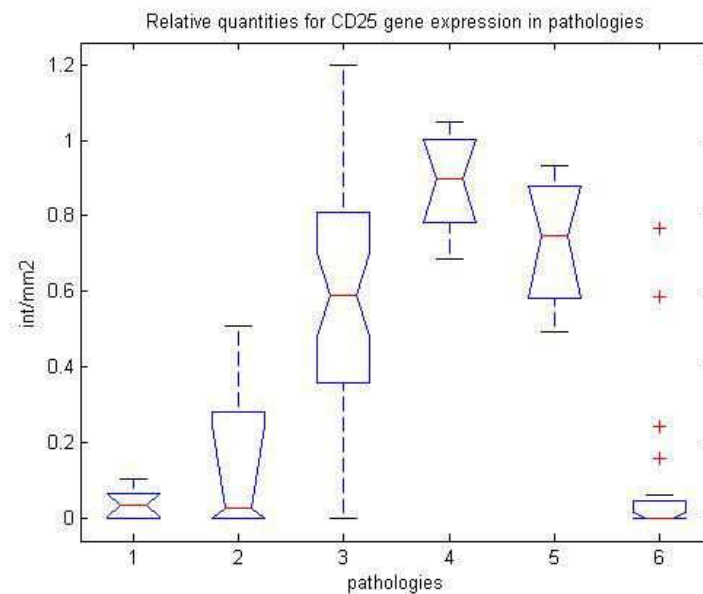


Fig 14. Intensitățile relative de exprimare ale ARNm CD25 (1.cancer mamar, 2.cancer bronhopulmonar, 3. amigdalită acută, 4. artrită reumatoidă, 5. lupus eritematos sistemic, 6.control)

Cele mai ridicate valori pentru exprimarea ARNm *CD25* au fost obținute în inflamația cronică. Intensitățile relative pentru exprimarea *CD25* în cancerul mamar și bronhopulmonar au fost mici, și din punct de vedere statistic sunt similare între ele, precum și cu lotul martor ($P < 0.05$). Mai mult, în alte probe de țesut tumoral, cum sunt cele rectale și cele renale, exprimarea ARNm *CD25* a fost la fel de scăzută și asemănătoare cu controlul.

CD25⁺ este marker fenotipic pentru limfocitele Treg.

III.2.2. Expimarea *ARNm IL-2*

Rezultatele noastre de screening arată valori ridicate ale intensităților relative pentru exprimarea *ARNm IL-2* în inflamația acută cum sunt prezentate și în Fig 14. *ARNm IL-2* nu este exprimat la pacienții control și nici la cei cu inflamație cronică sau cancer mamar.

În alte tipuri de tumori, cum sunt tumorile rectale (2 din numărul total de 2 cazuri), tumorile renale (2 din numărul total de 2 cazuri) și 1 probă de limfocite periferice din cancerul bronhopulmonar, apare *ARNm IL-2*.

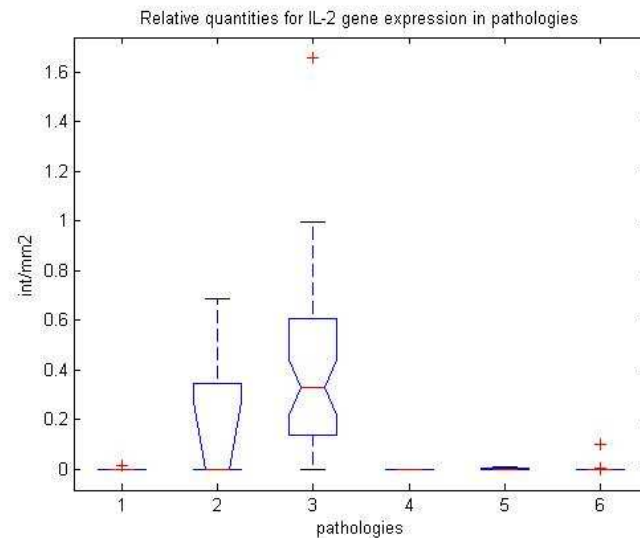


Fig 15. Intensitățile relative pentru exprimarea *ARNm IL-2* în neoplazie, inflamații și lotul control (1.cancer mamar, 2.cancer bronhopulmonar, 3. amigdalită acută, 4. artrită reumatoidă, 5. lupus eritematos sistemic, 6.control)

III.2.3. Expimarea *ARNm CD28*

În urma screeningului pentru exprimarea *ARNm CD28* am identificat toate cele opt variante alternative ale *ARNm*, care au fost descrise în limfocitele din sângele periferic de Manisha Deshpande și colab.,2002. Aceste variante alternative ale *ARNm* se pot identifica atât în limfocitele periferice cât și în infiltratul de țesut, așa cum sunt prezentate în Fig 16.

La prelucrarea datelor și analiza statistică s-a luat în considerare doar varianta 1 (cea mai lungă) NM_006139.

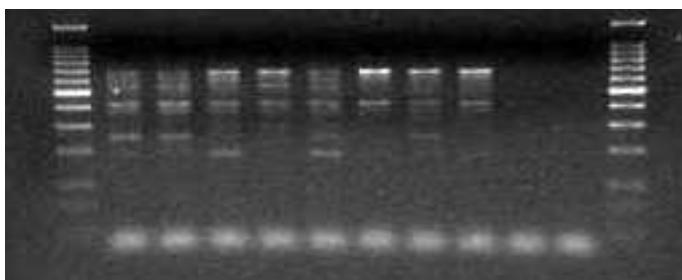


Fig 16. PCR a genei CD28

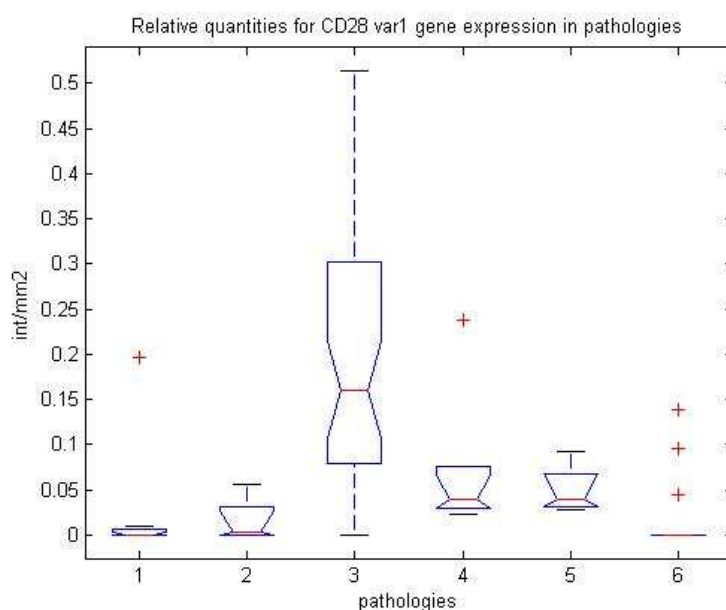


Fig 17. Exprimarea ARNm CD28 în cancer și inflamații (1. cancer mamar, 2. cancer bronhopulmonar, 3. amigdalită acută, 4. artrită reumatoidă, 5. lupus eritematos sistemic, 6. control)

Analizele noastre arată supraexprimarea semnificativă a ARNm CD28 în amigdalita acută ($P < 0.05$) față de lotul control. Intensitatea relativă a CD28 este mai mică în inflamațiile cronice decât în cele acute, după cum este prezentată pe figura Fig 17. Pacienții cu cancer mamar și bronhopulmonar arată exprimare redusă de CD28, la fel ca și în cazul tumorilor renale și a celor rectale.

Limfocitele periferice ale lotului control nu exprimă CD28.

III.2.4. Exprimarea ARNm TGF β 1

Determinările noastre arată suprareglarea semnificativă a exprimării ARNm TGF β 1 în inflamațiile cronice - în artrită reumatoidă și lupusul eritematos sistemic - în comparație cu lotul

martor, așa cum se poate observa în Fig.18. De asemenea, *TGF β1* este supraexprimat și în comparație cu amigdalita acută. Limfocitele totale ale limfocitelor martor și cele din țesutul tumoral prezintă exprimare moderată a ARNm *TGF β1*, care din punct de vedere statistic, sunt similare ($P < 0.05$).

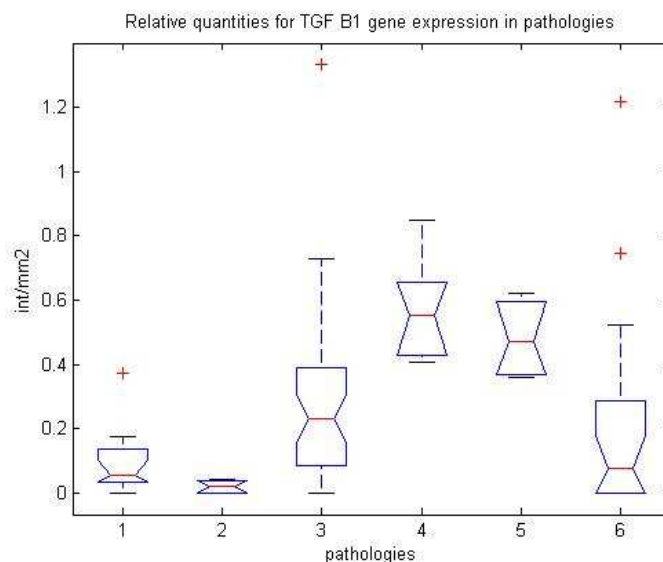


Fig 18. Intensitățile relative pentru exprimarea ARNm *TGF β1* (1. cancer mamar, 2. cancer bronhopulmonar, 3. amigdalită acută, 4. artrită reumatoidă, 5. lupus eritematos sistemic, 6. control)

TGF β1 este implicată în efectul de supresie al celulelor Treg, atât în model murin cât și la cel uman.

Mai mult, creșterea cantității *TGF β1* poate fi asociată cu stările canceroase avansate și poate avea rol de prognostic (Łuczyński W. și colab., 2010),(Sato Y. și colab., 2010),(Zhao X.P. și colab., 2010),(Domschke C. și colab.,2004), (Chod J., și colab.,2008).

III.2.5.Exprimarea ARNm *CTLA-4*

Perechea de amorsă folosită pentru amplificarea ARNm *CTLA-4* permite evidențierea din limfocite periferice și din țesut a ambelor variante ale ARNm *CTLA-4*, și anume: ARNm varianta 1 (NM_005214) și ARNm varianta 2 (NM_001037631).

Profilele de exprimare obținute pentru cele două variante sunt destul de asemănătoare, așa cum sunt prezentate în Fig 19.

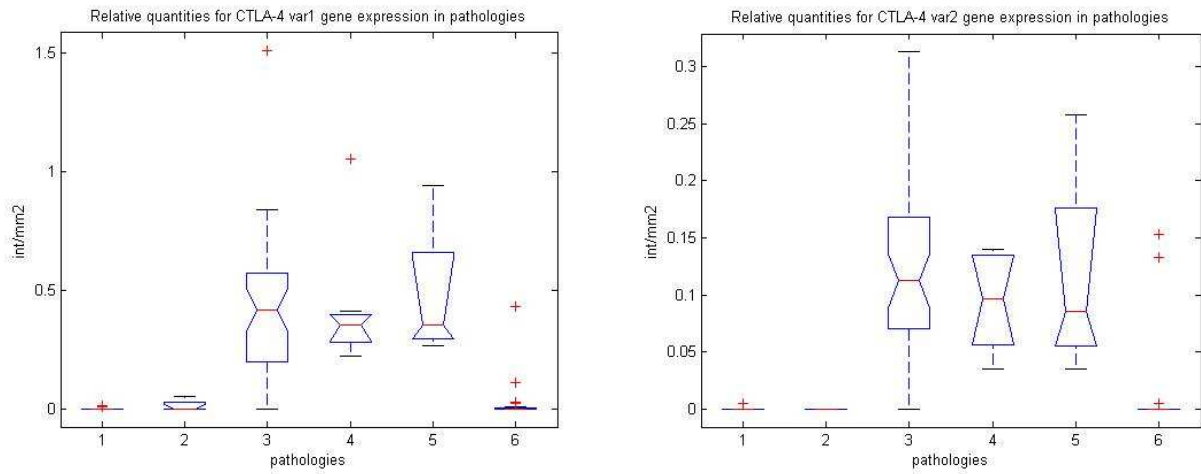


Fig 19. Exprimarea ARNm *CTLA-4 var1* și *CTLA-4 var2* în cancer și inflamații (1.cancer mamar, 2.cancer bronhopulmonar, 3. amigdalită acută, 4. artrită reumatoidă, 5. lupus eritematos sistemic, 6.control)

Rezultatele noastre arată supraexprimarea ARNm *CTLA-4* în cele două tipuri de inflamații, în comparație cu lotul control și cu țesutul tumoral. Intensitățile relative obținute sunt similare statistic ($P < 0.05$) pentru inflamația acută, artrita reumatoidă și lupusul eritematos sistemic. Pe de altă parte, variantele *CTLA-4* nu sunt exprimate nici la lotul control și nici în țesutul tumoral mamar, însă o exprimare scăzută s-a putut observa pentru ambele variante în limfocitele periferice sanguine al pacienților cu cancer mamar și în tumorile renale solide.

Zhang a observat că are loc suprareglarea *TGF β 1*, *IL-2R (CD25)*, *GITR*, *CD28* și *CTLA-4 (CD152)* în urma activării limfocitelor T tumor specifice în comparație cu limfocitele T naive (Zhang X., și colab.,2002).

III.2.6. Exprimarea ARNm *GITRL*

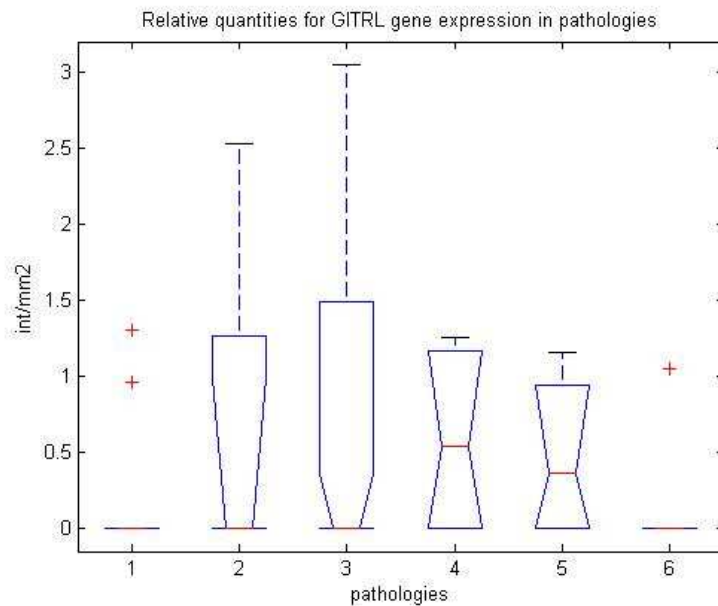


Fig 20. Intensitățile relative ale exprimării *GITRL* în cancer și inflamații (1. cancer mamar, 2. cancer bronhopulmonar, 3. amigdalită acută, 4. artrită reumatoidă, 5. lupus eritematos sistemic, 6. control)

ARNm *GITRL* nu s-a putut identifica în cazul lotului control, dar 2 din $n=10$ piese de tumori mamare și 1 din $n=4$ probe de limfocite periferice ale pacienților cu neoplazie bronhopulmonară exprimă *GITRL*. Asemănător, *GITRL* este exprimat și în alte probe de țesut tumoral: 2 din totalul de 2 tumori rectale, 2 din totalul de 2 tumori renale și 2 din total de 2 probe de limfocite periferice ale pacienților cu cancer mamar.

GITRL a fost suprareglat semnificativ ($P < 0.05$) în aproximativ jumătate din cazurile cu inflamație acută sau cu inflamație cronică, așa cum este prezentat în Fig.20.

Conform datelor lui Baltz (Baltz K.M., și colab.,2007), *GITRL* este exprimat constitutiv de celulele tumorale umane și modulează imunogenitatea lor, secreția de citokine și interacțiunea celulelor transformate cu celulele NK, acestea din urmă exprimând *GITR*. Stimularea *GITRL* reduce drastic exprimarea altor molecule imunostimulatoare, cum sunt CD40 și CD45 (Baltz K.M. și colab., 2007). De asemenea, semnalizarea prin *GITRL* modifică exprimarea moleculelor reglatoare și stimulează producția citokinei inhibitoare *TGF β* de către celulele tumorale.

Tuyaerts (2007), nu a putut identifica exprimarea *hGITRL* în celulele mononucleare ale sângelui, dar exprimarea *GITRL* a fost evidențiată în linii de limfocite B, transformate cu EBV, cum sunt

888-EBV, 1087-EBV, 1088-EBV sau linia de celule HUVEC, EA.Hy926 (Tuyaeerts S. și colab., 2007).

III.2.7. Exprimarea ARNm *GITR*

GITR nu este exprimat în limfocitele periferice ale lotului control. În inflamația cronică și acută s-a arătat suprareglarea semnificativă a *GITR* ($P < 0.05$) în comparație cu lotul control. Toate probele de inflamație cronică arată cantități ridicate ale *GITR*, pe când valorile obținute pentru inflamația acută au fost mai scăzute așa cum se prezintă în Fig.21.

În tumorile mamare și bronhopulmonare *GITR* este exprimat, dar este subreglat semnificativ în comparație cu lotul cu inflamații. În alte probe de țesut tumoral, cum sunt tumorile renale, de colon și la limfocitele periferice ale pacienților cu cancer mamar, *GITR* apare în majoritatea cazurilor în cantități relativ reduse.

La șoareci, limfocitele Treg exprimă constitutiv cantități mai ridicate de *GITR* decât limfocitele T convenționale, indiferent de starea lor de activare sau de localizare (Coe D. și colab. 2010).

În modelul de șoarece, utilizarea concomitentă a anticorpilor anti-CTLA-4/anti-*GITR* mAb se finalizează prin activitate antitumorală mai eficientă decât în cazul utilizării separate a acestor anticorpi.

Utilizarea anticorpilor anti-CTLA-4 duce la creșterea numărului de limfocite T CD8+ în țesutul tumoral. Folosirea anticorpilor anti-*GITR* are ca și consecință creșterea rezistenței limfocitelor T CD8+ tumor specifice la Treg, supraexprimarea *CD25* și secreția mărită de citokine, care se concretizează în efect antitumoral mărit.

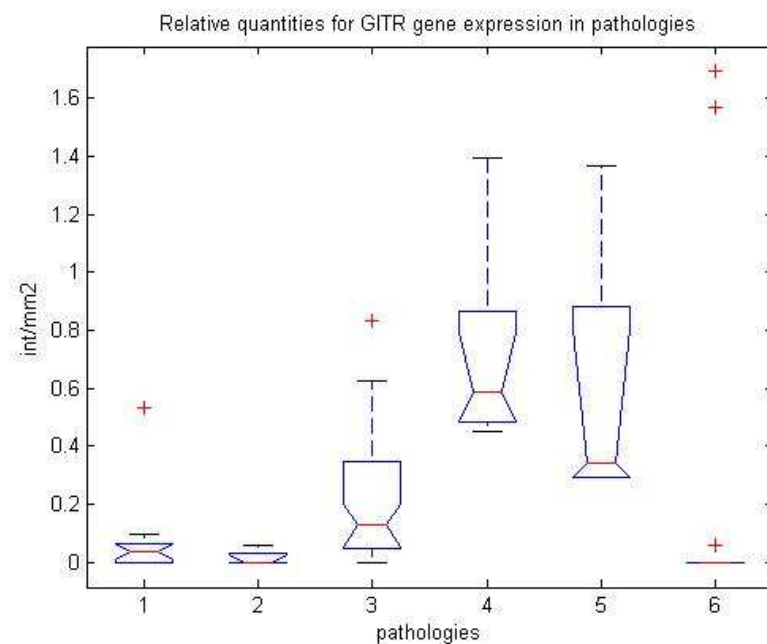


Fig 21. Intensitățile relative pentru exprimarea ARNm GTR ARNm (1. cancer mamar, 2. cancer bronhopulmonar, 3. amigdalită acută, 4. artrită reumatoidă, 5. lupus eritematos sistemic, 6. control)

Cohen și colab. au demonstrat că utilizarea anticorpilor anti-GITR este eficientă în răspunsul antitumoral, la modelul de melanom, prin micșorarea numărului Treg antitumoral și prin stimularea limfocitelor T responder (Cohen A.D. și colab., 2010). Ponte și colab. au propus utilizarea anticorpilor anti-GITR ca și adjuvant de vaccinuri în terapia tumorilor hematologice, tumorilor solide, și în infecțiile virale (Ponte J.F. și colab., 2010). Mai mult, acest anticorp a fost utilizat într-un model de vaccin de limfocite T, care elimină definitiv și complet tumorile de col uterin cauzate de virusul papiloma la modelul murin. Acest efect nu a fost obținut cu alți adjuvanți cum sunt anti-CD4 sau interferon- α (Hoffmann C și colab., 2010).

III.2.8. Expirarea ARNm *IL-18*

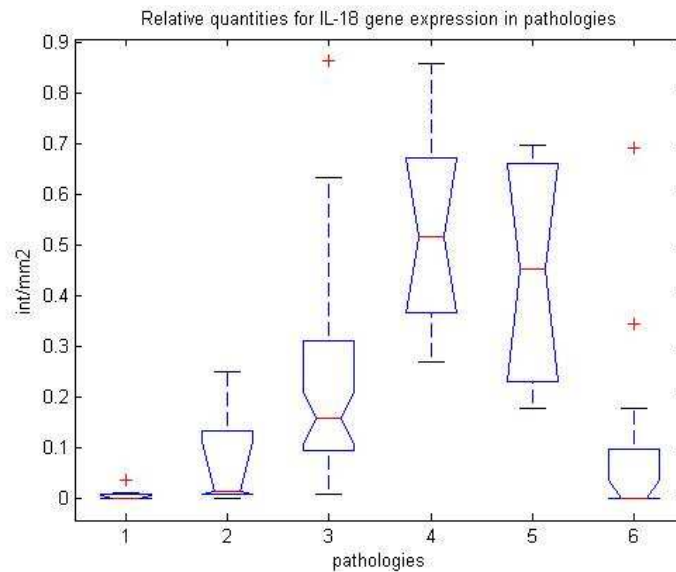


Fig 22. Expirarea ARNm *IL-18* în cancer și inflamații (1. cancer mamar, 2. cancer bronhopulmonar, 3. amigdalită acută, 4. artrită reumatoidă, 5. lupus eritematos sistemic, 6. control)

Rezultatele noastre arată exprimarea scăzută a *IL-18* în țesutul tumoral mamar, așa cum este prezentat pe Fig 22. Un număr de 5 din totalul de 10 pacienți exprimă *IL-18*, procent care este similar cu cel obținut la lotul control (8 dintr-un total de 19 cazuri).

În alte țesuturi tumorale decât cele mamare, *IL-18* este supraexprimată, după cum urmează: în tumorile ovariene (2 din $n=2$), tumorile rectale (2 din $n=2$), tumorile renale (2 din $n=2$), tumorile de colon (2 din $n=2$) și cel de col uterin în stare avansată (1 din $n=1$). În cazurile de tumori ovariene, tumori rectale, tumori renale și de colon *IL-18* este suprareglată comparativ cu țesuturile tumorale mamare și față de lotul control ($P < 0.05$).

De asemenea, exprimarea *IL-18* a fost determinată și din limfocitele periferice ale pacienților cu tumori mamare ($n=2$), tumoră ovariană ($n=1$), tumoră rectală ($n=1$) și tumorile bronhopulmonare ($n=4$). Cantitățile relative ale *IL-18* din limfocitele periferice au fost similare cu cele găsite în limfocitele din infiltratul tumoral, cu excepția tumorilor mamare ($P < 0.05$), unde cantitățile au fost mai ridicate în limfocitele periferice.

Pentru exprimarea *IL-18* cele mai mari valori au fost obținute în inflamația cronică, urmată de inflamația acută așa cum este prezentată în Fig 22.

ARNm *IL-18* este suprareglat semnificativ în limfocitele periferice ale pacienților cu artrită reumatoidă și cu lupus eritematos sistemic în comparație cu ale celor cu inflamație acută, pacienții neoplazici și subiecți martor.

IV. CONCLUZII

În această lucrare ne-am propus studierea exprimării ARNm al unor gene implicate în modularea imună având rol costimulator.

Subiectul este destul de complex, nu numai din cauza faptului că reglarea imună este un fenomen cu multe variabile, ci și datorită faptului că aceeași genă cu rol costimulator poate avea rol imunostimulator sau imunosupresor în funcție de condițiile fiziologice, de micromediul dat de citokine, în funcție de diferite populații celulare implicate, sau în funcție de intensitatea semnalului de stimulare. De asemenea, diferențele pot fi determinate și de modelul experimental ales, model uman sau de șoarece, model in vitro, ex-vivo sau in vivo.

Pentru a avea o imagine cât mai apropiată de realitatea fiziologică am lucrat cu țesuturi umane ex-vivo, bazându-ne pe datele preliminare obținute pe modele experimentale pe șoareci și pe modele de culturi celulare.

Pentru a evidenția diferențele de exprimare a genelor costimulatoare în diferite condiții am lucrat cu probe provenind de la pacienți cu inflamație acută, cronică, pacienți cu neoplazie și cu voluntari sănătoși.

Pentru a obține date legate de exprimarea genelor imunomodulatoare am ales diferite tipuri de inflamații: dintre care artrita reumatoidă și lupusul eritematos sistemic, care sunt considerate cele mai frecvente boli autoimune și amigdalita acută, care este o inflamație frecventă, dar foarte puțin studiată la nivel molecular.

Am lucrat cu limfocitele totale sanguine sau infiltrate din țesuturi, iar valorile obținute pentru exprimarea genelor reprezintă suma exprimărilor pe diferite populații de limfocite dintre care limfocitele T responder și cele reglatoare au importanță deosebită. Un pas următor ar fi separarea limfocitelor și studierea exprimării genelor costimulatoare pe diferite populații de limfocite și urmărirea eficienței tratamentului antiinflamator la acest nivel.

Metoda aleasă este semicantitativă și presupune optimizarea exigentă a reacțiilor, analiza datelor, iar valorile obținute sunt valori relative de exprimare.

Ca urmare, am obținut procentul probelor pozitive și cantitățile relative pentru exprimarea fiecărei gene, care a permis construirea unor profile de exprimare în diferite patologii inflamatorii și neoplazii. Pe baza acestor profile s-a realizat analiza comparativă a genelor exprimate în diferitele tipuri de inflamații, în neoplazii respectiv la lotul control.

Metoda de prezentare grafică utilizată, realizată cu programul Matlab, alături de indicatorii statistici valoarea minimă, maximă, mediana, și distribuția prezintă și semnificația statistică a datelor.

În concluzie am observat, că în diferite condiții ARNm pentru o serie de gene imunomodulatoare sunt suprareglate, pe când altele nu se exprimă:

1). Profilul de exprimare a genelor costimulatoare la lotul control este caracterizat prin exprimarea moderată a ARNm *TGFBI*, *CD25* și *IL-18* și lipsa *GITR*, *GITRL*, *IL-2*, *CD28*, *CTLA-4 var1* și *CTLA4 var2*.

2). Infiltratul de țesut în amigdalita acută, din punct de vedere al exprimării genelor, poate fi caracterizată prin supraexprimarea tuturor genelor studiate față de lotul control. În comparație cu inflamațiile cronice ARNm *IL-2* și *CD28* sunt supraexprimate; *CD25*, *TGF β1*, *GITR* și *IL-18* sunt subexprimate iar *CTLA-4* și *GITRL* sunt similare. Aceasta arată numărul ridicat, sau mai posibil activitate pronunțată atât a limfocitelor T responder $CD4^+CD25^-$, cât și a Treg ca urmare a inflamației acute.

3). Profilul de exprimare al ARNm obținut din limfocitele sanguine ale pacienților cu artrită reumatoidă și lupus eritematos sistemic sunt similare din punct de vedere statistic ($p < 0.05$).

4). În inflamația cronică cantitatea relativă exprimată a *TGF B1* este mai ridicată decât în inflamația acută, la fel și *GITR*, *CD25*, și *IL-18*. Cantitățile relative ale *GITRL*, *IL-2*, *CTLA var1*, *2* sunt asemănătoare ($P < 0,05$), iar *IL-2* și *CD28* sunt subexprimate.

GITR, *GITRL*, *CTLA-4 var1* și *CTLA-4 var2* sunt exprimate în cantități relative mari în ambele tipuri de inflamații. În inflamația cronică *GITR*, *GITRL* și *CTLA* își au originea în limfocitele Treg. *CTLA-4* de pe limfocitele T inhibă activarea limfocitelor, astfel reglează toleranța periferică.

5). În infiltratul de țesut tumoral am evidențiat intensități relative mărite față de controale pentru ARNm *CD25*, *CD28*, *GITR*, *GITRL*, *TGF β1*. Nu am putut identifica ARNm *IL-2* și *CTLA-4* în țesutul tumoral. Intensitățile ridicate pentru *CD25*, *GITR*, *GITRL*, *TGF β1* se

datorează prezenței unor limfocite Treg. Aceste date sunt în concordanță cu teoria actuală, conform căreia celulele tumorale evită sistemul imunitar al organismului gazdă cu ajutorul limfocitelor Treg, care protejează tumora de limfocitele responder.

6). *GITR* este exprimat de macrofagi activați și de celule mononucleare, este suprareglat prin activare în limfocitele T responder $CD4^+CD25^-$. *GITR* este utilizat ca și marker fenotipic pentru limfocitele supresoare $CD4^+CD25^+$. În modelul murin *GITR* are rol de inițiere al răspunsului efector în subpopulații $CD4$ și $CD8$, iar prin stimularea *GITR* limfocitele T responder devin mai puțin sensibile la efectul supresor al Treg. În modelul murin s-a dovedit efectul sinergic al *GITR* și $CD28$.

GITRL este exprimat constitutiv pe o serie de celule prezentatoare de antigen (macrofagi, celule dendritice, limfocite B) și celule endoteliale. De asemenea, Tuyaers nu a putut identifica *GITRL* pe limfocitele periferice sanguine, dar a demonstrat exprimarea *hGITRL* în linii de limfocite B transformate cu virusul EBV.

Studii recente au evidențiat supraexprimarea *GITR* și *GITRL* din macrofagele din lichidul sinovial și din limfocitele din sângele periferic ale pacienților cu artrită reumatoidă. Mai mult, stimularea *GITR* din macrofagele sinoviale cu anticorpi *anti-GITR* induce citokine inflamatorii. În concordanță cu cele de mai sus, rezultatele noastre arată că *GITR* și *GITRL* nu se exprimă la lotul control, dar am evidențiat supraexprimarea ARNm *GITR* și *GITRL* în toate tipurile de inflamații. Astfel presupunem că sistemul *GITR-GITRL* are efect proinflamator în inflamația acută și în cea cronică. S-a dovedit chiar, că în modelul murin sistemul *GITRL-GITR* este mai important în reglarea limfocitelor $CD8$ decât al $CD28$.

7). *IL-18* este o citokină proinflamatoare. În modelul murin utilizarea anticorpilor de neutralizare al *IL-18* reduce severitatea inflamațiilor.

În concordanță cu acestea sunt și datele noastre de screening pentru ARNm *IL-18*, care arată suprareglarea semnificativă *IL-18* în limfocitele periferice ale pacienților cu inflamație cronică și suprareglarea mai moderată în cazul inflamației acute.

8). *IL-2* și $CD28$ sunt markeri de activare al limfocitelor.

Astfel, rezultatele noastre arată suprareglarea semnificativă al *IL-2* și $CD28$ în amigdalita acută, ceea ce este de înțeles pentru că într-o inflamație acută predomină procesele inflamatoare. *IL-2* nu se exprimă în artrita reumatoidă, lupus eritematos sistemic, în neoplazii și la martori. Conform observațiilor lui Thornton și colab. *IL-2* este secretată de limfocitele T responder

activate și este necesară pentru proliferarea limfocitelor T responder $CD4^+CD25^-$ în prezența Treg $CD4^+CD25^+$. În mod similar, *IL-2* secretată de limfocitele T responder $CD4^+CD25^-$ este implicată în reglarea funcției supresoare al Treg $CD4^+CD25^+$ (Thornton și colab., 1998).

9). Cu toate că în artrita reumatoidă și lupusul eritematos sistemic nu se exprimă *IL-2* am demonstrat supraexprimarea receptorului de mare afinitate pentru *IL-2*, și anume *CD25*. La fel este și în neoplazii.

10). În concordanță cu cele observate de Mottonen și colab. am demonstrat supraexprimarea ARNm *CTLA-4 ARNm var 1* și *var 2* în inflamația cronică. În artrita reumatoidă și lupusul eritematos sistemic exprimarea ARNm *CD28* este mai ridicată decât la lotul control. *CD28* are rol proinflamator, pe când *CTLA-4* are rol antiinflamator.

11). Am demonstrat că *TGF β1* este suprareglat în limfocitele periferice ale pacienților cu artrita reumatoidă și lupus eritematos sistemic în comparație cu lotul control și inflamația acută. Citokina *TGF β1* este secretată de macrofagi proinflamatori, are rol în inhibarea inflamației și regenerarea țesuturilor. O serie de celule exprimă receptori pentru *TGF β1*, iar proteina poate regla pozitiv sau negativ factorii de creștere.

Cercetările arată că *TGF β1* este supraexprimat la pacienții neoplazici având rol proinflamator. Baltz a determinat cantități mai ridicate de *TGF β1* în supernatantul limfocitelor Treg.

Conform rezultatelor noastre exprimarea *TGF β1* în neoplazii, amigdalită acută și la lotul control este asemănătoare.

Rezultatele noastre reprezintă prima etapă în evaluarea exprimării ARNm al genelor costimulatoare în organismul uman, și pune bazele pentru cercetări ulterioare mai aprofundate ale acestor aspecte.

Deși, există diferențe funcționale între mecanismele costimulării în culturi celulare, în modelul murin și uman, rezultatele obținute sunt promițătoare pentru aplicații practice în terapia imună a bolilor autoimune sau a cancerului.

În concluzie, rezultatele noastre contribuie la înțelegerea mecanismelor fiziologice de reglare a limfocitelor în inflamații și boli neoplazice.

Cunoașterea exprimării genelor imuno-modulatoare face posibilă diferențierea în profile de inflamație acută, cronică și neoplazie și de asemenea contribuie la elaborarea unor căi de intervenție țintite.

V. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Bae E.M, Reverse signaling initiated from GITRL induces NF- κ B activation through ERK in the inflammatory activation of macrophages, 2008, *Molecular Immunology* 45, 523-533
2. Baltz KM, Krusch M, Bringmann A, Brossart P, Mayer F, Kloss M, Baessler T, Kumbier I, Peterfi A, Kupka S, Kroeber S, Menzel D, Radsak MP, Rammensee HG, Salih HR. Cancer immunoediting by GITR ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions. *FASEB Journal*. 2007;21(10):2442-2454
3. Beissert S., Regulatory T cells, 2006, *J of Investigative Dermatology*, 126: 15-25
4. Chod J, Zavadova E, Halaska MJ, Strnad P, Fucikova T, Rob L. Preoperative transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) plasma levels in operable breast cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2008;29(6):613-6
5. Clark R., Old Meets New: The interaction Between Innate and Adaptive Immunity, 2005, *The J. of Investigative Dermatology*, 629-637
6. Coe D, Begom S, Addey C, White M, Dyson J, Chai JG. Depletion of regulatory T cells by anti-GITR mAb as a novel mechanism for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Sep;59(9):1367-77
7. Cohen AD, Schaer DA, Liu C, Li Y, Hirschhorn-Cymerman D, Kim SC, Diab A, Rizzuto G, Duan F, Perales MA, Merghoub T, Houghton AN, Wolchok JD. Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One*. 2010 May 3;5(5):e10436
8. Deshpande M, Venuprasad K, Parab P.B. Saha B and Mitra D. A Novel CD28 mRNA Variant and Simultaneous presence of Various CD28 mRNA Isoforms in Human T Lymphocytes, *Human Immunology*, 2002 Jan; 63 (1): 20-23.
9. Domschke C, Schuetz F, Ge Y, Seibel T, Falk C, Brors B, Vlodaysky I, Sommerfeldt N, Sinn HP, Kühnle MC, Schneeweiss A, Scharf A, Sohn C, Schirrmacher V, Moldenhauer G, Momburg F, Beckhove P. Intratumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8420-8
10. Ermann J., Fathman C. G., Costimulatory signals controlling regulatory T cells. *PNAS*. 100,15292-15293 (2003)
11. Hoffmann C, Stanke J, Kaufmann AM, Loddenkemper C, Schneider A, Cichon G. Combining T-cell vaccination and application of agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expressing tumors in mice. *J Immunother*. 2010 Feb-Mar;33(2):136-45.
12. Jung MY, Kim SH, Cho D, Kim TS. Analysis of the expression profiles of cytokines and cytokine-related genes during the progression of breast cancer growth in mice. *Oncol Rep*. 2009 Nov;22(5):1141-7
13. Jury EC, Flores-Borja F, Kalsi HS, Lazarus M, Isenberg DA, Mauri C, Ehrenstein MR. Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol*. 2010 Feb;40(2):569-78.

14. Kanamaru F, Youngnak P, Hashiguchi M, Nishioka T, Takahashi T, Sakaguchi S, Ishikawa I, Azuma M. Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25⁺ regulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7306-14
15. Kwon BS, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, Xing L, Liu D, Wang SX. Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem.* 1999;274:6056–6061
16. Łuczyński W, Stasiak-Barmuta A, Juchniewicz A, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Hendo E, Kos J, Kretowski A, Górska M, Chyczewski L, Bossowski A. The mRNA expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in T regulatory cells in children with type 1 diabetes. *Folia Histochem Cytobiol.* 2010 Jan 1;48(1):93-100
17. Mao H, Zhang L, Yang Y, Zuo W, Bi Y, Gao W, Deng B, Sun J, Shao Q, Qu X. New Insights of CTLA-4 into Its Biological Function in Breast Cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010 Jun 25.
18. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4⁺ CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2005 May; 140(2): 360–367.
19. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca RA. New member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:6216-6221
20. Park S, Yoon SY, Kim KE, Lee HR, Hur DY, Song H, Kim D, Bang SI, Cho DH. Interleukin-18 induces transferrin expression in breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Lett.* 2009 Dec 28;286(2):189-95
21. Ponte JF, Ponath P, Gulati R, Slavonic M, Paglia M, O'Shea A, Tone M, Waldmann H, Vaickus L, Rosenzweig M. Enhancement of humoral and cellular immunity with an anti-glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor monoclonal antibody. *Immunology.* 2010 Jun;130(2):231-42
22. Ronchetti S, Nocentini G, Bianchini R, Krausz LT, Migliorati G, Riccardi C.J. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein lowers the threshold of CD28 costimulation in CD8⁺ T cells. *Immunol.* 2007 Nov 1;179(9):5916-26
23. Rudiger A., How T lymphocytes switch between life and death, 2006, *Eur. J. Immunol.* 36: 1654-1658
24. Sato Y, Harada K, Itatsu K, Ikeda H, Kakuda Y, Shimomura S, Ren XS, Yoneda N, Sasaki M, Nakanuma Y. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor- β 1/Snail Activation Aggravates Invasive Growth of Cholangiocarcinoma. *Am J Pathol.* 2010 May 20
25. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002 Feb;3(2):135-42
26. Stephens L.G., 2004, Engagement of Glucocorticoid- Induced TNFR family-related Receptor on Effector T cells by its Ligand Mediates Resistance to Suppression by CD4 + CD25⁺ T cells, *The J. of Immunology*, 173: 5008-5020
27. Thornton A.M., 1998., CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro By Inhibiting Interleukin 2 Production, *The J. of Experimental Medicine*, 188, 2: 287-296

28. Tuyaerts S, Meirvenne V, Bonehill A, Heirman C, Corthals J, Waldmann H, Breckpot K, Thielemans K, Aerts JL. Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J of Leukocyte Biology*. 2007;82(1):93-105
29. Tuyaerts S, Meirvenne V, Bonehill A, Heirman C, Corthals J, Waldmann H, Breckpot K, Thielemans K, Aerts JL. Expression of human GITRL on myeloid dendritic cells enhances their immunostimulatory function but does not abrogate the suppressive effect of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J of Leukocyte Biology*. 2007;82(1):93-105
30. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Tiittanen M, Savilahti E. Infiltration of Foxp3- and Toll-like receptor-4-positive cells in the intestines of children with food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Apr;50(4):367-76.
31. Xue H, Liang F, Liu N, Song X, Yuan F, Luo Y, Zhao X, Long J, Sun Y, Xi Y. Potent Antirheumatic Activity of a New DNA Vaccine Targeted to B7-2/CD28 Costimulatory Signaling Pathway in Autoimmune Arthritis. *Hum Gene Ther*. 2010 Aug 9.
32. Zhang X, Chen Z, Huang H, Gordon JR, Xiang J. DNA microarray analysis of the gene expression profiles of naïve versus activated tumor-specific T cells. *Life Sci*. 2002 Nov 8;71(25):3005-17.
33. Zhao XP, Huang YY, Huang Y, Lei P, Peng JL, Wu S, Wang M, Li WH, Zhu HF, Shen GX. Transforming growth factor-beta1 upregulates the expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4) in human breast cancer MCF-7 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2010 Mar;31(3):347-54

VI. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE DE DOCTORAND LEGATE DE SUBIECTUL TEZEI DE DOCTORAT

Articole/studii publicate în reviste de specialitate de circulație internațională recunoscute, din țară și străinătate:

- 1. I. Mészáros, T. L. Krausz, E. Fischer-Fodor, Sz. Lányi, *Expression profiles of immunomodulatory genes in human solid tumors*, Revista Română de Medicină de Laborator, in press., indexat in Thomson Reuters**
- 2. I. Mészáros, T. L. Krausz, E. F. Fischer, Z. Zs. Major, O. Popescu, *Expression of immunomodulatory genes in inflammatory and autoimmune diseases*, Romanian Biotechnological Letters, in press, indexat in Thomson Reuters**