

Study the effect of cell-to-cell contact of naive T cells and BCG stimulated fibroblasts on regulatory T cell induction

Fatemeh Jalali Shirazi¹, Ahmad Zavarani-Hosseini^{1*}, Sara Soudi¹, Shahrzad Noujehi²

1. Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Department of Immunology, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

(Received: 29 Aug 2015

Accept: 24 Nov 2015)

Abstract

Background: Lymph node stromal fibroblasts are interconnected with TCD+4 cells and affect their phenotype and function. Understanding the nature of these interactions under unusual conditions like infections will help to their application in control and regulation of immune responses.

Materials and methods: Lymph node fibroblasts were affected in BCG primed immune environment by both in-vitro and in vivo method. Fibroblasts isolated through enzymatic digestion and surface markers and co-cultured with spleen isolated naive T cells for -72hours in a cell-to-cell contact manner. Then naive T cells were removed and cultured -72hours more and assessed for regulatory T cell marker expression and IL4-, TGF- β 1, IL10- and IFN- γ cytokine production.

Results: Results showed that in in-vivo stimulation method, more regulatory T cells was induced by BCG stimulated fibroblasts compared to non-stimulated fibroblasts. In this method, IFN- γ cytokine production was reduced and IL10- and TGF- β 1 regulatory cytokine production was increased. In contrast, in in-vitro stimulation method, regulatory T cell induction by BCG stimulated fibroblasts was significantly less than non-stimulated ones. In addition, both IL10- and IFN- γ production was increased that indicate induction of IFN- γ producing T-cells.

Conclusion: Present study shows that fibroblasts affect regulatory T-cell induction and T-cell function. The result of this effect is dependent to environment. In this study, fibroblasts were isolated from two different BCG stimulated immune environment. They induced more regulatory responses in in-vivo condition and reduced regulatory responses in in-vitro environment. This result demonstrates different fibroblast behavior at different phases of infection.

Keywords: Fibroblast, Regulatory T-cell, BCG

Corresponding author: Ahmad Zavarani-Hosseini
Email:zavarana@modares.ac.ir

بررسی اثر تماس مستقیم سلول‌های T بکر با سلول‌های فیبروبلاست تحریک شده با BCG بر القای سلول‌های T تنظیمی

فاطمه جلالی شیرازی^۱، احمد زواران حسینی^{۱*}، سارا صعودی^۱، شهرزاد نوجه دهی^۲

۱- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- گروه ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۹/۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۶/۷

چکیده

سابقه و هدف: فیبروبلاست‌های استرومایی گره لنفی در ارتباط تنگاتنگ با سلول‌های $CD4^+ T$ قرار دارند و بر فنوتیپ و عملکرد آنها اثر می‌گذارند. آگاهی از نحوه میان‌کنش این سلول‌ها به‌ویژه در شرایط ناپایدار همچون عفونت‌ها، به استفاده‌های بعدی از آنها در کنترل و تنظیم پاسخهای ایمنی کمک خواهد کرد.

روش بررسی: سلول‌های فیبروبلاست گره لنفی به دو روش *in vitro* و *in vivo*، در محیط ایمنی واجد BCG، قرار داده شدند. فیبروبلاست‌ها به روش هضم آنزیمی و مارکرهای اختصاصی سطحی، جدا شدند و به مدت ۷۲ ساعت با لنفوسیت‌های T بکر به روش تماس مستقیم هم‌کنشی شدند. سپس لنفوسیت‌های T جدا شدند و پس از ۷۲ ساعت کشت از نظر میزان بیان مارکرهای T تنظیمی و سایتوکاین‌های $IL-10$ ، $TGF-\beta 1$ ، $IL-4$ و $IFN-\gamma$ بررسی شدند.

یافته‌ها: میزان القای سلول‌های T تنظیمی توسط فیبروبلاست‌های تحریک شده با BCG در روش *in vivo* بیش از فیبروبلاست‌های تحریک نشده است. در این روش میزان سایتوکاین $IFN-\gamma$ کاهش و سایتوکاین‌های تنظیمی $TGF-\beta 1$ و $IL-10$ افزایش داشت. درحالی‌که میزان القای سلول‌های T تنظیمی توسط فیبروبلاست‌های تحریک شده با BCG در روش *in vitro* به‌طور معناداری کمتر از فیبروبلاست‌های تحریک نشده بود. در این روش علاوه بر سایتوکاین تنظیمی $IL-10$ ، سایتوکاین $IFN-\gamma$ نیز افزایش داشت که نشان‌دهنده القای جمعیت سلول‌های T مولد $IFN-\gamma$ است.

نتیجه‌گیری: سلول‌های فیبروبلاست نه تنها بر القای سلول‌های T تنظیمی از سلول‌های T بکر و عملکرد لنفوسیت‌های T اثر می‌گذارند، میان‌کنش آنها با لنفوسیت‌های T متأثر از محیط است. در این بررسی فیبروبلاست‌ها در دو محیط ایمنی متفاوت در حضور GCB قرار داشتند که در روش *oviv ni*، به افزایش پاسخ تنظیمی و در روش *in vitro* به کاهش سلول‌های T تنظیمی منجر شد. به نظر می‌رسد تفاوت رفتار فیبروبلاست‌ها در مراحل مختلف عفونت باشد.

کلیدواژه: فیبروبلاست، لنفوسیت T تنظیمی، BCG

مقدمه:

نقش‌های ساختاری و ترمیمی، فیبروبلاست‌ها به‌ویژه آن‌هایی که در اعضای لنفی ساکن هستند، در برهم‌کنش نزدیک با سلول‌های ایمنی قرار دارند و از طریق تأمین سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، ایجاد داربست سلولی برای رفت‌وآمد سلول‌ها، عرضه آنتی‌ژنی و بیان مولکول‌های چسبنده، به شکل‌گیری پاسخ‌های ایمنی کمک می‌کنند و به تورلانس یا پاسخ ایمنی فعال منجر شود. در واقع فنوتایپ و موقعیت سلول‌های استرومایی لنفاوی و سیگنال‌هایی که تولید می‌کنند یک کنترل محلی برای پروراندن و هدایت پاسخ‌های ایمنی مناسب‌تر علیه پاتوژن‌هاست (۷).

سلول‌های گره لنفی براساس یک تقسیم‌بندی کلی به سلول‌های خونی و سلول‌های

فیبروبلاست‌ها به شکل سلول‌های چسبنده (۱) دوکی یا ستاره‌ای شکل با تعداد متنوع زوایید سیتوپلاسمی غیرمنظم معرفی می‌شوند (۲). این سلول‌ها در مراحل مختلف تکامل و در بافت‌های مختلف از سلول‌های اندوتلیال، اپی‌تلیال، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) مغز استخوان و سایر مزانشیم‌های پیش‌ساز بافت منشأ می‌گیرند (۳-۵). این سلول‌ها از نظر متابولیسمی فعالند. تولیدکننده و ترمیم‌کننده ماتریکس خارج سلولی (ECM) هستند و نقش قابل ملاحظه‌ای در تکامل، حفظ و ترمیم بافت‌ها، بهبود زخم، تنظیم تحمل خودی و التهاب بر عهده دارند (۶). علاوه بر

نویسنده مسئول: : احمد زواران حسینی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، zavarana@modares.ac.ir

تربیت مدرس استفاده شدند. از گره لنفی ناحیه زیر بغل موش‌ها برای جداسازی فیبروبلاست و از طحال آن‌ها برای جداسازی لنفوسیت‌های T بکر و سلول‌های طحال استفاده شد. در بررسی ex-vivo به موش‌های آزمایش، BCG ۱۰۶، CFU (تهیه شده از انستیتو پاستور تهران) به صورت زیرجلدی در ناحیه‌ای نزدیک به گره لنفی زیر بغل تزریق شد. در موش‌های کنترل در همان ناحیه، ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمکی فسفات PBS تزریق شد.

هضم آنزیمی گره‌های لنفی:

برای جداسازی فیبروبلاست، گره‌های لنفی ناحیه زیر بغل در موش‌های آزمایش و کنترل خارج شد و در محیط کشت DMEM-F12 روییخ قرار داده شد. با استفاده از تیغ جراحی شماره ۲۲ استریل، گره‌های لنفی قطعه قطعه شد و هر پنج قطعه به یک لوله جداگانه منتقل شد و با دومیلی‌لیتر از ترکیب آنزیمی ۸ میلی گرم در میلی‌لیتر آنزیم دیسپاز، ۰/۴ میلی گرم در میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز IV و ۰/۱ میلی گرم در میلی‌لیتر DNase1 در محیط DMEM-F12 تیمارش. بعد از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از یک پیپت میلی‌لیتری ۵ به آرامی پیپت شد، مایع رویی جمع‌آوری شد و به آن محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد FBS با حجم مساوی اضافه شد تا فعالیت آنزیم متوقف شود. به قطعه باقیمانده دوباره دو میلی‌لیتر از ترکیب آنزیمی اضافه و به انکوباتور منتقل شد. این عمل چند بار انجام شد تا قطعات گره لنفی به طور کامل هضم شوند. مایع رویی جمع‌آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون سلولی از مَش نایلونی عبور داده شد.

جداسازی فیبروبلاست گره لنفی و تعیین فنوتیپ

سوسپانسیون سلولی که از هضم گره‌های لنفی به‌دست آمده بود، در محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۱۵ درصد FBS کشت داده شد. سلول‌های غیرچسبنده از محیط خارج شد و به مدت یک هفته در انکوباتور CO2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. وقتی یک لایه از سلول‌های شبه فیبروبلاست کف فلاسک‌ها را پوشاند، سلول‌ها با استفاده از آنزیم تریپسین از فلاسک‌ها جمع‌آوری و شمارش شدند. با آنتی بادی بیوتین‌دار ضد CD45 و استرپتاویدین میکرو بید (Miltenyi Biotec, Germany) به مدت ۴۵ دقیقه مجاور شدند. سلول‌های استرومایی CD45- غیرهماتوپتیک توسط ستون LS به روش Magnetic-activated cell sorting (MACS) از سلول‌های CD45+ جدا شدند. کشت اولیه سلول‌های گره لنفی موش شامل سلول‌های LCE و FRC است که بیان CD31، یکی از وجه تمایز این دو سلول است. براین اساس سلول‌های فیبروبلاست CD31-CD45- از سلول‌های اندوتلیال CD31+CD45- با استفاده از آنتی بادی بیوتین دار ضد CD31، به روش MACS جدا شدند. سلول‌های فیبروبلاست جدا شده، شمارش شدند و با استفاده از آنتی‌بادی اولیه anti-mouse CD31، آنتی بادی ثانویه anti-rat IgG-FITC و anti-mouse CD45-FITC (eBioscience, USA) برای تعیین خلوص، رنگ‌آمیزی شدند. علاوه بر این سلول‌ها برای مارکرهای مزانشیمی فیبروبلاست نظیر CD44، CD90، CD105، CD29 که بیان آن‌ها در سلول‌های فیبروبلاست بالا است (۲۵) با استفاده از آنتی‌بادی‌های موشی ضد CD44-PE، CD29-PE، CD105-PE و CD90-PE (eBioscience, USA) رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری FACSCanII متعلق به گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس آنالیز شدند.

جداسازی لنفوسیت‌های CD4+ T بکر

سلول‌های طحال با پرفیوژن محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۲۰ درصد FBS به طحال موش‌های BALB/c خارج شدند. گلبول‌های قرمز با استفاده از بافر لیز RBC (NH4Cl, KHCO3, Na2EDTA) حذف شدند. سلول‌ها سه بار با استفاده از محیط کشت مذکور شسته شدند. در تمام موارد از دور سانتریفیوژ ۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سوسپانسیون سلولی با استفاده از مَش نایلونی ۷۰ میکرونی فیلتر و سپس شمارش شد. سلول‌های T بکر با استفاده از کیت CD4+CD62L+T cell isolation شرکت (Miltenyi Biotec, Germany) طبق دستور شرکت سازنده جداسازی شدند. به‌طور خلاصه، به ۱۰ سلول در بافر MACS BSA-PBS-EDTA2Mm (5%)، ۱۰۰ میکرولیتر از کوکتلی حاوی آنتی بادی‌های بیوتین دار مونوکلونال موشی ضد CD8a، CD45R، CD11b، CD25، CD49b،

استرومایی غیرخونی به ترتیب براساس حضور و عدم حضور مارکر CD45 در سطح خود تقسیم می‌شوند (۸). فیبروبلاست‌های رتیکولار (FRC) از سلول‌های استرومایی غیرخونی گره لنفی با مشخصه CD31- و gp38+ هستند و زیرگروه استرومایی اصلی در گره لنفی را تشکیل می‌دهند (۹-۱۲). سلول‌های فیبروبلاست رتیکولار در نواحی لنفوسیت، اجزای ماتریکس خارج سلولی از قبیل آنتی ژن ER-TR7، فیبرولین و اجزای مشترک غشای پایه یعنی لامینین و فیبرونکتین را تولید می‌کنند که می‌توانند در تشکیل شبکه FRC و اتساع و انقباض شبکه سلولی و عرضه مولکول‌هایی مثل کموکاین‌ها دخیل باشند (۷). این سلول‌ها بیان بالایی از رونوشت‌های پروتئین‌های تراغشایی القا شونده توسط اینترفرون به نام IFITM-1، IFITM-2 و IFITM-3 را دارند که با دفاع میزبان علیه ویروس‌های آنفلوآنزا، نیل غربی و دانگو ارتباط دارد. همچنین TLR3 و TLR4 را بیان می‌کنند که در شروع التهاب با افزایش بیان ژن مولکول‌های پاسخگو در فاز حاد و کموکاین‌های التهابی CCL5 و CXCL9 و اجزای کلیدی مسیر پردازش و عرضه آنتی‌ژن MHCII نقش دارند (۱۳). سلول‌های FRC، ماتریکس خارج سلولی را به‌طور کامل احاطه کرده‌اند و این ساختار شبکه‌ای از سینوس زیر کپسولی شروع و به HEV‌ها ختم می‌شوند. بنابراین لنفوسیت‌های T و B به محض ورود به گره به‌طور مستقیم بر سطح سلول‌های FRC قرار می‌گیرند (۷). FRC‌ها با بیان کلاژن IV بر سطح خود (۱۴)، توانایی اتصال و عرضه چندین کموکاین از جمله CCL13، CCL21، CCL19 را دارند که از این طریق حرکت لنفوسیت‌ها و DC‌های واجد گیرنده کموکاینی CCR7 در امتداد شبکه FRC را تسهیل می‌کنند (۱۵). این سایتوکاین‌ها به همراه سایتوکاین IL7 و کموکاین هموستاتیک CXCL12 توسط FRC‌ها تولید و موجب حفظ هموستاز لنفوسیت‌ها می‌شوند (۹، ۱۶). سلول‌های FRC با تغییر بیان کموکاین‌های مذکور در شرایط مختلف، ترافیک سلولی گره لنفی را کنترل می‌کنند. برای مثال کاهش بیان CCL21 در شرایط التهاب می‌تواند با افزایش دسترسی سلول‌های افکتور به سیگنال‌های بقا محدود در استرومای لنفاوی (IL7) و تجمع سلول‌های غیرپاسخگو را تغییر دهد و به تشکیل سلول‌های خاطره‌ای با عمر طولانی کمک کند (۱۲) یا افزایش بیان کموکاین‌هایی نظیر CXCL9 و CXCL10 به دنبال تحریک FRC‌ها با IFN-γ، سلول‌های T فعال را در موضع نگه دارد (۱۷).

سلول‌های استرومایی ساکن در گره لنفی، یک کلاس از سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن را تشکیل می‌دهند که در القای تولرانس به لنفوسیت‌های T مهم هستند (۲۲-۱۸). این سلول‌ها در شرایط هموستاز سطح پایینی از MHCII را بیان می‌کنند. اما سلول‌های LEC، FRC و BEC در شرایط عفونی و التهاب بیان MHCII و مولکول‌های مرتبط با پردازش و عرضه آنتی‌ژنی را افزایش می‌دهند که توانایی کنترل فعالیت سیستم ایمنی را به این سلول‌ها می‌دهد (۲۳، ۲۴). از سوی دیگر بیان MHCII توسط سلول‌های استرومایی برای حفظ سلول‌های T تنظیمی (Foxp3+) ضروری است و بدین وسیله با محدود کردن فعالیت سیستم ایمنی موجب حفظ هموستاز سیستم ایمنی می‌شوند. در واقع حفظ محیطی مجموعه Treg در شرایط پایدار نیازمند به عرضه وابسته به MHCII آنتی‌ژن‌های خودی است و برهم‌کنش به واسطه آنتی‌ژن بین سلول‌های استرومایی و سلول‌های Treg، سیگنال‌های اختصاصی بقا را برای Treg‌های تحریک شده با آنتی‌ژن فراهم می‌آورد (۲۳).

با در نظر گرفتن ارتباط تنگاتنگ سلول‌های فیبروبلاست با سلول‌های T در گره لنفی و ماهیت ذاتی گره لنفی به عنوان یک ارگان لنفی ثانویه، شناخت میزان و نوع اثر سلول‌های فیبروبلاست بر عملکرد سلول‌های T تحت شرایط غیرپایدار نظیر تومور و عفونت‌ها ضرورت دارد. آگاهی از نحوه میان‌کنش این سلول‌ها به استفاده‌های بعدی از سلول‌های فیبروبلاست در کنترل و تنظیم پاسخ‌های ایمنی کمک خواهد کرد. در پژوهش حاضر برای تعیین تاثیر فیبروبلاست‌ها در تمایز سلول‌های T، اثر فیبروبلاست‌های جدا شده از محیط واجد BCG با محیط فاقد آن بر تمایز سلول‌های T بکر به سلول‌های T تنظیمی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به روش in vitro انجام گرفت از موش‌های BALB/c، شش هفته‌ای ماده که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند، استفاده شد. موش‌ها عاری از هر گونه پاتوژن اختصاصی بودند و طبق قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه

یا همراه با (106CFU/well) BCG به فیبروبلاست اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت محیط رویی تعویض و سلول‌های طحال و BCG به طور کامل خارج شدند. یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی 1.06×10^6 نفوسیت‌های TCD4+CD62L اضافه شد. پس از ۷۲ ساعت، میزان القای سلول‌های Treg و سایتوکاین‌ها بررسی شد.

آنالیزهای فلوسایتومتری

۷۲ ساعت پس از همکشتی، سلول‌های T از سطح فیبروبلاست‌ها جمع‌آوری شدند و پس از دو بارشست و شو با PBS، شمارش و با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی Treg (eBioscience, USA) رنگ‌آمیزی شدند. برای رنگ‌آمیزی مارکرهای سطحی، از آنتی‌بادی موشی ضد CD4-FITC و آنتی‌بادی موشی ضد CD25-PE استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی مارکر داخل سلولی Foxp3، ابتدا سلول‌ها با استفاده از بافر permeabilization & fixation موجود در کیت، فیکس و نفوذپذیر شدند و سپس با آنتی‌بادی موشی ضد Foxp3-APC طبق دستورالعمل شرکت سازنده رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری FACScan II متعلق به گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس آنالیز شد.

اندازه‌گیری سایتوکاین

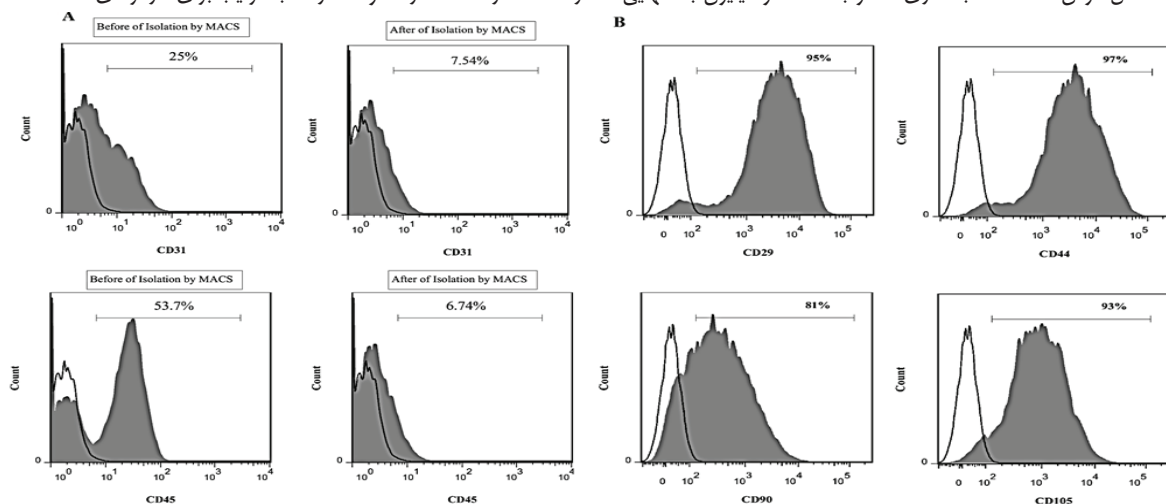
سایتوکاین‌های IFN- γ ، IL-4، IL-10 و TGF- β 1 در سوپروی همکشتی با استفاده از روش الایزای ساندویچ و براساس دستورالعمل کیت شرکت سازنده R&D Systems اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه دو چاهک در نظر گرفته شد.

آنالیزهای آماری

تمام آزمایش‌ها سه بار به صورت دوتایی انجام شد. برای آنالیز داده‌ها از داده‌ها میانگین گرفته شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار Prism5 (GraphPad Software, Inc) انجام و برای مقایسه میانگین‌ها از تست Post Hoc Tukey. One way ANOVA استفاده شد. برای آنالیز داده‌های فلوسایتومتری از نرم‌افزار FlowJo ۷.۶ استفاده و سطح کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

ارزیابی خلوص فیبروبلاست‌های جداسازی شده به روش MACS برای بررسی درصد خلوص سلول‌های جداسازی شده، نمونه‌ها قبل از عبور دادن سلول‌ها از ستون و بعد از آن، برای مارکرهای CD31 و CD45 (فیبروبلاست هیچ‌کدام را بیان نمی‌کند) به روش فلوسایتومتری رنگ‌آمیزی شدند. شکل ۱ نشان می‌دهد که پس از عبور از ستون، درصد سلول‌های CD31+ از میانگین ۲۵ درصد به ۷/۵۴ درصد و سلول‌های CD45+ از میانگین ۵۳/۷ درصد به ۶/۷۴ درصد کاهش پیدا کرده است و سلول‌های فیبروبلاست به این روش بامیانگین ۹۳ درصد تخلیص شده‌اند. همچنین این مارکرهای مزانشیمی فیبروبلاست به میزان میانگین ۹۵ درصد، ۹۷ درصد، ۸۱ درصد و ۹۳ درصد به ترتیب برای مارکرهای CD29، CD44، CD90 و CD105



شکل ۱. سلول‌های چسبنده گره لنفی پس از جداسازی و کشت در فلاسک‌های T۷۵ حاوی سلول‌های فیبروبلاست و اندوتلیال لنفاوی (CD31+) و سلول‌های هماتوپیتیک (CD45+) است. (A) درصد سلول‌های CD31+ و سلول‌های CD45+ (B) بیان مارکرهای فیبروبلاستی در سلول‌های جداسازی شده ..

TCR γ/δ , and Ter-119 اضافه شد و ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر آنتی بیوتین میکرو بید به آن افزوده شد و ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌ها از ستون LS عبور داده شد. در این مرحله سلول‌های TCD4+ از سایر سلول‌ها در طحال جداسازی شدند. در انتها سلول‌های TCD4+ بکر از دیگر سلول‌های TCD4+ با استفاده از 1.06μ آنتی بادی ضد CD62L- میکرو بید که ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده بود و از ستون، MACS عبور داده شده بود، جداسازی شدند. سلول‌های جداسازی شده با استفاده از یک لام هموسیتومتر شمارش شدند. میزان بقای سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو برابر ۹۰ درصد بود. قبل از هم کشتی با فیبروبلاست، سلول‌ها بایک میکروگرم در میلی‌لیتر Anti-CD3/CD28 به مدت ۲۴ ساعت تحریک شدند.

گروه‌های آزمایش و هم کشتی فیبروبلاست‌ها و نفوسیت‌های TCD4+ بکر در مدل Exvivo

گروه یک: سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از گره لنفی موش تحریک نشده با BCG همراه سلول‌های T بکر: FB (BCGneg)+T
گروه دو: سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از گره لنفی موش تحریک شده با BCG همراه سلول‌های T بکر: FB (BCG pos)+T

تعداد ۵۱۰X ۵/۲ فیبروبلاست در محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS به هر چاهک پلیت شش خانه اضافه شد و در طول شب درانکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵% CO2 قرار داده شد تا سلول‌ها به کف چاهک بچسبند. محیط رویی کشت فیبروبلاست‌ها خارج شد و با یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی 1.06×10^6 نفوسیت TCD4+CD62L +T جایگزین شد. پس از ۷۲ ساعت، میزان القای سلول‌های Treg و سایتوکاین‌ها بررسی شد.

گروه‌های آزمایش و هم کشتی فیبروبلاست‌ها و نفوسیت‌های TCD4+ بکر در مدل In vitro

گروه سه: سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از گره لنفی موش که ابتدا با سلول‌های طحال مجاور شده‌اند و سپس با سلول‌های T بکر هم کشتی شده‌اند (FB+Splnocyte+T)

گروه چهار: سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از گره لنفی موش که ابتدا با سلول‌های طحال و BCG مجاور شده و سپس با سلول‌های T بکر هم کشتی شده‌اند (FB+Splnocyte+BCG+T). شکل ۱ گروه‌های آزمایش را به صورت شماتیک نشان می‌دهد.

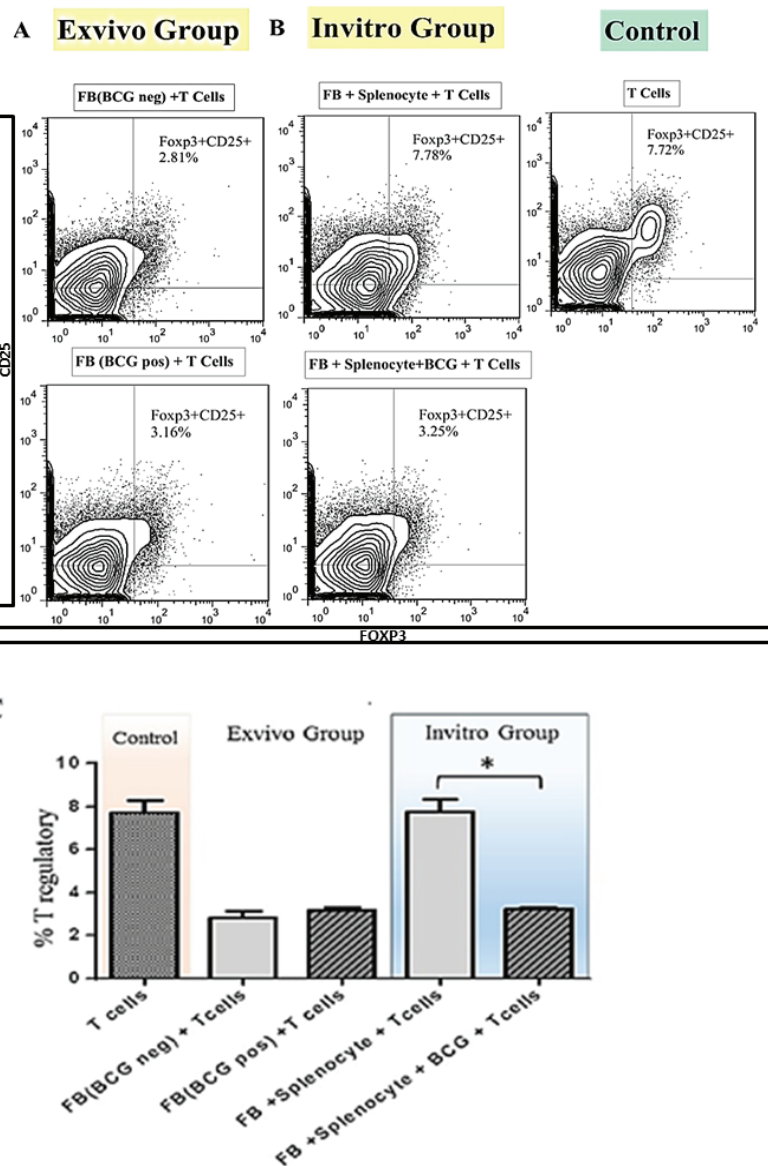
برای هم کشتی، تعداد ۵۱۰X ۵/۲ فیبروبلاست در محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS به هر چاهک پلیت شش خانه اضافه شد و در طول شب درانکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵% CO2 قرار داده شد تا سلول‌ها به کف چاهک بچسبند. سلول‌های طحال موش BALB/c جداسازی شد و به تعداد دو میلیون به تنهایی

با BCG، افزایش داشت. این افزایش از $55/6 \pm 1/2$ پیکوگرم در میلی‌لیتر به $1/98 \pm 62$ پیکوگرم در میلی‌لیتر در مورد IL-10، از 154 ± 2271 پیکوگرم در میلی‌لیتر به 11 ± 2693 پیکوگرم در میلی‌لیتر در مورد TGF- $\beta 1$ و از $3/84 \pm 0/26$ پیکوگرم در میلی‌لیتر به $0/8 \pm 4/6$ پیکوگرم در میلی‌لیتر در مورد IL-4، گزارش شد. این افزایش تنها در ترشح سایتوکاین TGF- $\beta 1$ معنادار ($P \leq 0.05$) بود. میزان تولید IFN- γ در سلول‌های هم‌کشتی شده با فیبروبلاست‌های تحریک شده با BCG کاهش کمی نسبت به تولید IFN- γ در سلول‌های هم‌کشتی شده با فیبروبلاست‌های تحریک نشده با BCG داشت که این کاهش معنادار نبود. شکل ۴، پروفایل سایتوکاینی گروه‌های ex-vivo را نشان می‌دهد.

القای T تنظیمی و پروفایل سایتوکاینی در مدل In vitro
براساس نتایج به دست آمده درصد القای Treg در گروه سه (FB+ Splenocyte + T Cells) تفاوتی با میزان Treg در تمایز خودبخودی نداشت، اما این میزان به‌طور معناداری در گروه چهار (FB+ Splenocyte+ BCG+ T Cells) که در آن لنفوسیت‌ها با فیبروبلاست‌های تحریک شده در محیط BCG هم‌کشتی شده بودند به $0/1 \pm 3/25$ درصد کاهش یافت (شکل 3B و 3C).

در بررسی سایتوکاین‌های ترشح شده از سلول‌های T، نتایج نشان داد که ترشح سایتوکاین‌های TGF- $\beta 1$ ، IL-10 و IFN- γ در سلول‌های T هم‌کشتی شده با فیبروبلاست‌های تحریک شده با BCG نسبت به فیبروبلاست‌های تحریک نشده با BCG، افزایش داشت. این افزایش از $4/2 \pm 68/42$ پیکوگرم در میلی‌لیتر به 13 ± 115 پیکوگرم در میلی‌لیتر در مورد IL-10، از 4 ± 39 پیکوگرم در میلی‌لیتر به 6 ± 121 پیکوگرم در میلی‌لیتر در مورد TGF- $\beta 1$ و از 11 ± 142 پیکوگرم در میلی‌لیتر به 30 ± 158 پیکوگرم در میلی‌لیتر در مورد IFN- γ گزارش شد. این افزایش تنها در ترشح سایتوکاین IL-10 معنادار ($P \leq 0.05$) بود.

جمع‌آوری و برای مارکرهای CD4، CD25، Foxp3 به روش فلوسایتومتری بررسی شدند. درصد القای Treg در گروه یک و گروه دو به ترتیب $2/81 \pm 0/25$ درصد و $3/16 \pm 0/14$ درصد است. بخش B، نتایج گروه In vitro را نشان می‌دهد. ابتدا فیبروبلاست‌ها با سلول‌های طحال و BCG مجاور شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت سلول‌های طحال و BCG خارج شدند و با سلول‌های T جایگزین شدند. سلول‌های T پس از ۷۲ ساعت هم‌کشتی به نسبت ۱۰ به ۱ با سلول‌های فیبروبلاست گره لنفی (این سلول‌ها قبل از هم‌کشتی) در گروه سه (FB+ Splenocyte + T Cells) و گروه چهار (FB+ Splenocyte + BCG + T Cells) جمع‌آوری و برای مارکرهای Foxp3، CD25، CD4، رنگآمیزی فلوسایتومتری شدند. درصد القای Treg در گروه سه و چهار به ترتیب $7/78 \pm 0/57$ درصد و $3/25 \pm 0/1$ درصد است. بخش C، نمودار درصد القای Treg در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. علامت (*) نشانه اختلاف معنادار بین گروه‌ها است ($P \geq 0.05$).



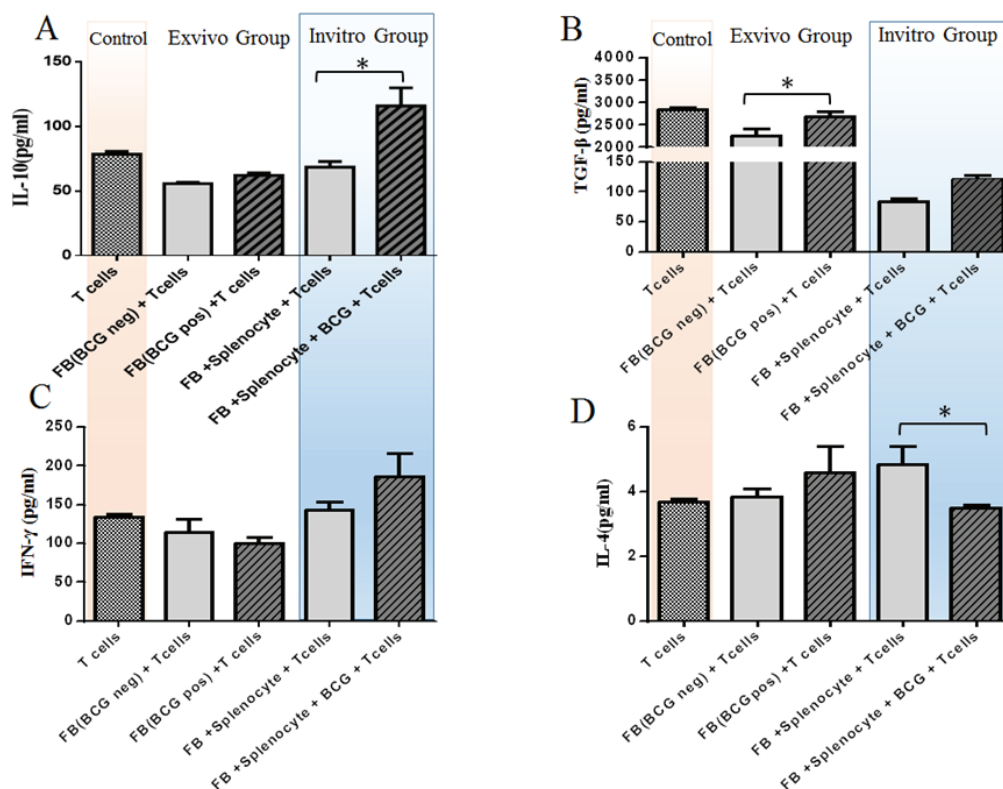
شکل ۳. بخش A، نتایج گروه Ex vivo را نشان می‌دهد. سلول‌های T پس از ۷۲ ساعت هم‌کشتی به نسبت ۱۰ به ۱ با سلول‌های فیبروبلاست گره لنفی در گروه یک (FB (BCG neg) + T Cells) و گروه دو (FB (BCG pos) + T Cells) قرار داده شدند.

CD90 و CD105 بیان شده است که نشان‌دهنده درصد وجود سلول‌های فیبروبلاست است.

القای T تنظیمی و پروفایل سایتوکاینی در مدل ex-vivo

براساس نتایج به دست آمده، میانگین میزان تمایز خودبخودی سلول‌های Treg در گروه کنترل که با Anti-CD28 و Anti-CD3 تحریک شده بودند برابر $7/72 \pm 0/57$ بود. این مقدار در گروه‌هایی که با فیبروبلاست هم‌کشتی شده بودند به‌طور معناداری به $2/81 \pm 0/25$ درصد و $3/16 \pm 0/14$ درصد به ترتیب در گروه تحریک نشده با BCG و گروه تحریک شده با BCG کاهش یافته بود. گرچه میزان القای Treg توسط فیبروبلاست‌های تحریک شده با BCG کمی بیشتر از فیبروبلاست‌های کنترل بود، اما اختلاف معناداری مشاهده نشد (شکل 3A و 3C).

در بررسی سایتوکاین‌های ترشح شده از سلول‌های T، نتایج نشان داد که ترشح سایتوکاین‌های TGF- $\beta 1$ ، IL-10 و IL-4 در سلول‌های T هم‌کشتی شده با فیبروبلاست‌های تحریک شده با BCG نسبت به فیبروبلاست‌های تحریک نشده



شکل ۳. پروفایل سایتوکاینی لنفوسیت‌های T همکشتی شده با سلول‌های فیبروبلاست گره لنفی را در دو مدل Ex vivo و In vitro، پس از ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. A نمودار ترشح IL-10، B نمودار ترشح TGF-β، C نمودار ترشح IFN-γ و D نمودار ترشح IL-4، علامت (*) نشانه اختلاف معنادار بین گروه‌ها است (P ≤ 0.05).

ایمنی شکل گرفته عمل می‌کنند. از سویی دیگر، مطالعه‌ها نشان داده است، BCG توانایی آلوده‌سازی سلول‌های فیبروبلاست را دارد و پیامد آلودگی BCG کاهش سطح بیان مولکول MHCII و ظرفیت عرضه آنتی ژن در این سلول‌ها است (۲۹). همان‌طور که پیش‌تر گفته شد بیان MHCII توسط سلول‌های استرومایی نظیر فیبروبلاست برای حفظ سلول‌های T تنظیمی (Foxp3+) ضروری است (۲۳، ۲۴). این نکته می‌تواند دلیلی بر کاهش القای رده Treg چهار (FB+ Splenocyte+ BCG+ T Cells) نسبت به گروه سه (FB+ Splenocyte+ T Cells) باشد. بررسی سایتوکاینی لنفوسیت‌های T این دو گروه نشان می‌دهد که در گروه تحت تأثیر BCG، هم تولید سایتوکاین‌های تنظیمی و هم تولید IFN-γ افزایش داشته است. در مطالعه‌ای از هم‌کشتی سلول‌های T با سلول‌های فیبروبلاست مایع مفصلی که از بیماران مبتلا به بیماری آرتریت روماتوئید جدا شده بودند، به نقش دوگانه سلول‌های فیبروبلاست اشاره شده است. در این مطالعه، سلول‌های فیبروبلاست، موجب شیفت تعادل بین سلول‌های Treg/ Tresp به سمت یک حالت التهابی در کل جمعیت TCD4 شدند و ترشح سایتوکاین‌های التهابی IFN-γ و TNF-α توسط سلول‌های T اجرایی CD25-، CD4+ را با وجود حفظ سلول‌های Treg تکثیر یافته با قدرت مهاري بالا، افزایش دادند. در این مطالعه بیان سطحی IL-15 در سلول‌های فیبروبلاست را مسئول فعال شدن سلول‌های T و ترشح سایتوکاین از طریق تماس مستقیم دانسته‌اند (۳۰). همچنین وجود یک زیرجمعیت از سلول‌های Treg در موش و انسان مشخص شده که پس از تحریک، IFN-γ تولید می‌کنند. این سلول‌ها همچنین IL-10، TGF-β و IL-4 تولید می‌کنند. چندین مطالعه بیان IL-17 و IFN-γ را توسط سلول‌های nTreg و iTreg در موش‌ها نشان داده‌اند که یک نقش التهابی خلاف انتظار را در بعضی موقعیت‌ها، حداقل در موش برای این سلول‌ها قائل شده‌اند. این سلول‌های iTreg+ IFN-γ در پاسخ به IFN-γ ایجاد می‌شوند و سنسوری برای IFN-γ در آغاز یک پاسخ التهابی با عملکرد مهاري برای پاسخ‌ها هستند (۳۱). مطالعه دیگری تمایز این سلول‌ها را به سلول‌های Th1 و Foxp3+ IFN-γ نشان داده و تأکید کرده است که این سلول‌ها توانایی تبدیل شدن به سلول‌های Foxp3+ IFN-γ را ندارند و در واقع این فنوتیپ را یک وضعیت گذرا از تبدیل شدن سلول‌های

(TGF-β/ IFN-γ: 9/26 و IL-10/ IFN-γ: 62/0) و مقایسه آنها با یکدیگر، میتوان نتیجه گرفت که فیبروبلاست‌هایی که تحت تأثیر اثر BCG بودند از عملکرد مهاري سلول‌های Treg القا شده حمایت کردند و هرچند تغییرهای سایتوکاینی بین گروه یک و دو به جز TGF-β معنادار نبود اما روند تغییرها نشان‌دهنده غلبه فنوتیپ مهاري بر فنوتیپ TH1 است که حاکی از اثر ایمنومودولاتوری سلول‌های فیبروبلاست چه در شرایط هموستاز و چه شرایط غیرهموستاز است.

در سال‌های اخیر کشف نقش حیاتی سلول‌های فیبروبلاست استرومایی گره لنفی در حفظ تولرانس ایمنی ضروری بوده است. این سلول‌ها توانایی اثر بر فنوتیپ و عملکرد سلول‌های CD4+ T را دارند و نه تنها توانایی تغییر مارکرهای سطحی و وضعیت فعال T را دارند، بلکه ویژگی عملکردی این سلول‌ها را نیز تغییر می‌دهند (۲۶). سلول‌های T تنظیمی القایی که با تحریک Anti-CD3/Anti-CD28 القا می‌شوند اگر چه از نظر قدرت و عملکرد ضعیف‌تر از سلول‌های iTreg عمل می‌کنند که با عرضه آنتی ژن توسط سلول‌های APC القا می‌شوند اما میزان بالاتری از فاکتور رونویسی Foxp3 را القا می‌کنند (۲۷). همچنین فعال شدن هم‌زمان مولکول CD28 و CD3، مسیر پیام‌رسانی کمک تحریکی را در سلول‌های T به راه می‌اندازد که موجب افزایش بیان رونوشت‌های CD25 در مدت یک تا چهار روز و بیان بالا و طولانی مدت CD25 می‌شود (۲۸). به نظر می‌رسد این دلایل می‌تواند توجیه مناسبی برای حضور T تنظیمی در گروه کنترل باشد.

اثر فیبروبلاست‌ها بر القای سلول‌های T تنظیمی در مدل In vitro

بررسی In vitro، کاهش میزان Treg را در گروه‌های هم‌کشتی فیبروبلاست در محیط BCG نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد در مدل In vitro، به دلیل اینکه مواجهه فیبروبلاست‌ها با سلول‌های T بلافاصله پس از مجاورت با BCG است، اثراتی که بر سلول‌ها T گذاشته شده، مشابه مراحل اولیه شکل‌گیری پاسخ ایمنی در عفونت است. کاهش معنادار القای Treg در گروه چهار (FB+ Splenocyte+ BCG+ T Cells) نسبت به گروه سه (FB+ Splenocyte+ T Cells) _ که فاقد عامل میکروبی BCG است نشان‌دهنده این نکته است که در مراحل اولیه شکل‌گیری پاسخ، فیبروبلاست‌ها در راستای افزایش پاسخ

درحالی‌که در مدل In Vitro برای قرار دادن سلول‌های فیبروبلاست در شرایط التهابی سلول‌های طحالی به محیط افزوده شدند که به طور مسلم این سلول‌ها واجد خاطره ایمنولوژیک مختص به شرایط محیطی خود بوده‌اند و همین امر می‌تواند دلیلی بر تفاوت میزان القای Treg و ترشح سایتوکاینی در دو گروه به خصوص افزایش القا در گروه سه باشد. (FB+Splenocyte + T Cells).

مدت اثر BCG بر سلول‌های فیبروبلاست و شکل دسترسی به آنتی ژن: یک دلیل که می‌تواند توجیه‌کننده تفاوت در تغییرهای ترشح سایتوکاینی در دو مدل باشد. مدت زمان متفاوتی است که BCG در محیط حضور داشته است. مدل In Vitro، بیانگر اثر عروقه BCG و مراحل ابتدایی شکل‌گیری پاسخ ایمنی است. درحالی‌که مدل Ex vivo، مدت زمان طولانی‌تری در معرض BCG بوده است و تغییرهای محیطی بیشتری (جداسازی و کشت) را تجربه کرده است. البته تأثیرهای آن بر سلول‌های T، بیشتر به اتفاقاتی که در بدن شکل می‌گیرد، شبیه است.

میزان BCG که سلول‌ها در معرض آن قرار گرفته‌اند در دو گروه متفاوت است. در مدل Ex vivo، BCG توسط لنف یا سلول‌های APC به گره منتقل شده است که به طور مسلم غلظت آنتی‌ژنی از حالتی که BCG به محیط کشت اضافه شده، کمتر بوده است. همچنین در اثر دفاع موضعی در محل تزریق اشکالی با اندازه متفاوت از BCG وارد گره شده است.

تشکر و قدردانی:

از دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی برای انجام این پروژه قدردانی می‌شود.

منابع:

- Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009;94 (2): 258-63.
- Langevin HM, Cornbrooks CJ, Taatjes DJ. Fibroblasts form a body-wide cellular network. *Histochemistry and cell biology*. 2004;122 (1): 7-15.
- Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013;1832 (7): 1070-8.
- Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in cell biology*. 2014.
- Lee CH, Shah B, Moiola EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120 (9): 3340.
- Alt E, Yan Y, Gehmert S, Song YH, Altman A, Gehmert S, Vykoukal D, Bai X. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biology of the Cell*. 2011;1. 208-197: (4)03.
- Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9 (9): 618-29.
- Roosendaal R, Mebius RE. Stromal cell-immune cell interactions. *Annual review of immunology*. 2011;29: 23-43.
- Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature immunology*. 2007;8 (11): 1255-65.
- Fletcher AL, Malhotra D, Acton SE, Lukacs-Kornek V, Bellemare-Pelletier A, Curry M, Armant M, Turley SJ. Reproducible isolation of lymph node stromal cells reveals site-dependent differences in fibroblastic reticular cells. *Frontiers in immunology*. 2011;2.

Treg Foxp3+ iTreg به سلول‌های اجرایی IFN- γ دانسته است (۳۲). به نظر می‌رسد رفتار دوگانه فیبروبلاست‌ها در شرایط التهابی و احتمال القای سلول‌های IFN- γ +iTreg توسط این سلول‌ها و امکان حضور دیگر جمعیت‌های القایی از سلول‌های T فعال به خصوص سلول‌های Th1 توجیه مناسبی از حضور توانمند سایتوکاین‌های IFN- γ ، IL-10، TGF- β باشد و فیبروبلاست‌ها همان طور که توانسته‌اند اثر بازدارندگی در القای Treg داشته باشند، می‌توانند عامل محرک تولید IFN- γ در سلول‌های T اجرایی القا شده در محیط آزمایش باشند.

از نکات دیگر کاهش معنادار ترشح TGF- β در دو گروه مدل In vitro نسبت به گروه کنترل است که به نظر می‌رسد حضور سلول‌های T فعال در کنار فیبروبلاست‌ها، بر ترشح TGF- β توسط این سلول‌ها اثر گذاشته است. زیرا در مقاله‌های بسیاری به توانایی ترشح TGF- β توسط فیبروبلاست‌ها اشاره شده است. از دلایلی که می‌توان برای این موضوع ذکر کرد ترشح بیشتر IFN- γ در گروه چهار (FB+ Splenocyte+ BCG+ T Cells) است که در مطالعه‌ای به اثر این سایتوکاین بر سلول‌های فیبروبلاست که موجب کاهش ترشح TGF- β می‌شود، اشاره شده است که وابسته به مسیر سیگنالینگ JAK/STAT و افزایش بیان Smad7 است (۳۳). همچنین می‌توان آن را اثر BCG بر سلول‌های فیبروبلاست در گروه چهار (FB+ Splenocyte+ BCG+ T Cells) دانست.

اختلاف در دوم مدل In Vitro و Ex vivo ناشی از چیست؟

Microenvironment متفاوت: در مدل Ex vivo، سلول‌های فیبروبلاست در محیطی در معرض BCG قرار گرفته‌اند که در شرایط فیزیولوژیک بدن و در محیط گره لنفی بوده است،

- Bajénoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*. 2006;25 (6): 989-1001.
- Kataikai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2004;200 (6): 783-95.
- Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, Lukacs-Kornek V, Tayalia P, Gonzalez SF, Elpek KG, Chang SK, Knoblich K, Heer ME. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nature immunology*. 2012;13 (5): 499-510.
- Kramer RH, Rosen SD, McDonald KA. Basement-membrane components associated with the extracellular matrix of the lymph node. *Cell and tissue research*. 1988;252 (2): 367-75.
- Yang B-G, Tanaka T, Jang MH, Bai Z, Hayasaka H, Miyasaka M. Binding of lymphoid chemokines to collagen IV that accumulates in the basal lamina of high endothelial venules: its implications in lymphocyte trafficking. *The Journal of Immunology*. 2007;179 (7): 4376-82.
- Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97 (23): 12694-9.
- Malhotra D, Fletcher AL, Turley SJ. Stromal and hematopoietic cells in secondary lymphoid organs: partners in immunity. *Immunological reviews*. 2013;251 (1): 160-76.
- Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH. Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207 (4): 681-8.
- Nichols LA, Chen Y, Colella TA, Bennett CL, Clausen BE, Engelhard VH. Deletional self-tolerance to a melanocyte/melanoma antigen derived from tyrosinase is mediated by a radio-resistant cell in peripheral and

- mesenteric lymph nodes. *The Journal of Immunology*. 2007;179 (2): 993-1003.
20. Fletcher AL, Lukacs-Kornek V, Reynoso ED, Pinner SE, Bellemare-Pelletier A, Curry MS, Collier A-R, Boyd RL, Turley SJ. Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207 (4): 689-97.
21. Lee J-W, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura A-r, Heath JK, Turley SJ. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nature immunology*. 2007;8 (2): 181-90.
22. Magnusson FC, Liblau RS, Von Boehmer H, Pittet MJ, Lee JW, Turley SJ, Khazaie K. Direct presentation of antigen by lymph node stromal cells protects against CD8 T-cell-mediated intestinal autoimmunity. *Gastroenterology*. 2008;134 (4): 1028-37.
23. Baptista AP, Roozendaal R, Reijmers RM, Koning JJ, Unger WW, Greuter M, Keuning ED, Molenaar R, Goverse G, Sneeboer MM. Lymph node stromal cells constrain immunity via MHC class II self-antigen presentation. *eLife*. 2014;3: e04433.
24. Dubrot J, Duraes FV, Potin L, Capotosti F, Brighthouse D, Suter T, LeibundGut-Landmann S, Garbi N, Reith W, Swartz MA. Lymph node stromal cells acquire peptide-MHCII complexes from dendritic cells and induce antigen-specific CD4+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211 (6): 1153-66.
25. Lämmermann T, Sixt M. The microanatomy of T-cell responses. *Immunological reviews*. 2008;221 (1): 26-43.
26. Vancheri C, Mastruzzo C, Trovato-Salinaro E, Gili E, Furno DL, Pistorio MP, Caruso M, La Rosa C, Crimi C, Failla M. Interaction between human lung fibroblasts and T-lymphocytes prevents activation of CD4+ cells. *Respiratory research*. 2005;6 (1): 103.
27. Zhao C, Shi G, Vistica BP, Hinshaw SJ, Wandu WS, Tan C, Zhang M, Gery I. Induced regulatory T-cells (iTregs) generated by activation with anti-CD3/CD28 antibodies differ from those generated by the physiological-like activation with antigen/APC. *Cellular immunology*. 2014;290 (2): 179-84.
28. CerdanC, Martin Y, Courcoul M, Brailly H, Mawas C, Birg F, Olive D. Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28. Demonstration of combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *The Journal of Immunology*. 1992;149 (7): 2255-61.
29. Mariotti S, Sargentini V, Pardini M, Giannoni F, De Spirito M, Gagliardi MC, Greco E, Teloni R, Fraziano M, Nisini R. Mycobacterium tuberculosis may escape helper T cell recognition by infecting human fibroblasts. *Human immunology*. 2013;74 (6): 722-9.
30. Benito-Miguel M, García-Carmona Y, Balsa A, de Ayala CP, Cobo-Ibáñez T, Martín-Mola E, Miranda-Carús M-E. A dual action of rheumatoid arthritis synovial fibroblast IL-15 expression on the equilibrium between CD4+ CD25+ regulatory T cells and CD4+ CD25- responder T cells. *The Journal of Immunology*. 2009;183 (12): 8268-79.
31. Daniel V, Sadeghi M, Wang H, Opelz G. CD4+ CD25+ Foxp3+ IFN- γ + human induced T regulatory cells are induced by interferon- γ and suppress alloresponses nonspecifically. *Human immunology*. 2011;72 (9): 699-707.
32. Feng T, Cao AT, Weaver CT, Elson CO, Cong Y. IL-12 converts Foxp3+ regulatory T cells to Foxp3+ IFN- γ + T cells with inhibitory functions during induction of colitis. *Gastroenterology*. 2011;140 (7): 2031.
33. Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, Burdick MD, Lin YQ, Dohadwala M, Gardner B. IL-7 inhibits fibroblast TGF- β production and signaling in pulmonary fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109 (7): 7-931).