



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Iwona Monika Szopa

**Opracowanie metod aktywacji
i różnicowania limfocytów T
izolowanych z krwi obwodowej psów
domowych (*Canis lupus familiaris*)**

The development of methods for activation and differentiation
of T lymphocytes isolated from the peripheral blood
of domestic dogs (*Canis lupus familiaris*)

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

dr hab. Małgorzaty Gajewskiej, prof. SGGW

Katedra Nauk Fizjologicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2025 rok

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 27.10.2025 Czytelny podpis promotora Małgorzata Gajda

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 27.10.2025r. Czytelny podpis autora rozprawy Jana Szyma

*Serdecznie dziękuję Pani Promotor dr hab. Małgorzacie Gajewskiej, prof. SGGW
za nieocenione wsparcie, cierpliwość i inspirujące wskazówki,
które towarzyszyły mi przy realizacji tej rozprawy doktorskiej.
Ogromna wiedza Pani Promotor, naukowa przenikliwość i otwartość na dyskusję
stanowiły dla mnie nie tylko źródło motywacji,
ale także wzór rzetelności badawczej i pasji naukowej.
Dziękuję za zaufanie, które pozwoliło mi rozwijać własne pomysły
oraz za życzliwość i wyrozumiałość, dzięki którym praca nad doktoratem stała się
niezwykle cennym doświadczeniem – zarówno zawodowym, jak i osobistym.
Podziękowania składam także Pani dr hab. Kindze Majchrzak-Kuligowskiej
za pomoc i przekazaną wiedzę
oraz wszystkim Współpracownikom, którzy wspierali mnie
w realizacji pracy doktorskiej.*

Badania naukowe będące przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej były wykonywane w ramach:

- projektu pt. „Modification of signaling pathways of canine Th17 lymphocytes subset to improve adoptive cellular immunotherapy for humans” („Modyfikacja ścieżek sygnałowych w limfocytach subpopulacji Th17 na modelu psa w celu poprawy adoptywnej immunoterapii komórkowej u ludzi”) realizowanego w ramach programu FIRST TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (POIR.04.04.00-00-3EE9/17-00)
- projektu Preludium 22 pt. „Określenie roli cytokin wydzielanych przez limfocyty Th17 w rozwoju czerniaka u psów - badania *in vitro*” finansowanego ze środków projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki (2023/49/N/NZ5/03656)



Fundacja na rzecz
Nauki Polskiej

Unia Europejska
Europejski Fundusz
Rozwoju Regionalnego



Spis treści

Streszczenie	11
Summary.....	13
Publikacje stanowiące rozprawę doktorską	15
Wykaz najczęściej stosowanych skrótów	17
1. Wstęp.....	19
1.1. Klasyfikacja limfocytów.....	19
1.1.1 Limfocyty B.....	20
1.1.2 Limfocyty T $\alpha\beta$	21
1.2. Subpopulacje limfocytów T pomocniczych	24
1.3. Limfocyty Th17	28
1.4. Aktywacja limfocytów T $\alpha\beta$	33
1.5. Aktywacja limfocytów T $\alpha\beta$ w warunkach <i>in vitro</i>	37
1.6. Pies domowy jako model do badań immuno-onkologicznych.....	38
2. Hipoteza i cele badawcze	41
2.1. Omówienie składu dysertacji.....	42
3. Materiały i metody	44
3.1. Materiał do badań	44
3.2. Izolacja PBL oraz limfocytów Th.....	44
3.3. Aktywacja limfocytów T z zastosowaniem mikrokulek magnetycznych	45
3.4. Aktywacja limfocytów Th z zastosowaniem mikrokulek epoksydowanych..	47
3.5. Różnicowanie limfocytów Th w kierunku fenotypu Th17	47
3.6. Immunofenotypowanie limfocytów oraz analiza wybranych parametrów funkcjonalnych za pomocą cytometrii przepływowej	49
3.7. Analiza ekspresji genów będących markerami wczesnych etapów aktywacji metodą Real-time PCR	52
3.7.1 Izolacja mRNA oraz reakcja odwrotnej transkrypcji	52
3.7.2 Reakcja Real-time PCR.....	52
3.8. Wykrywanie i identyfikacja białek związanych ze ścieżkami sygnałowymi MAPK oraz PI3K/Akt metodą Western blot	53
3.9. Ocena metabolizmu komórkowego z wykorzystaniem systemu Seahorse	55
3.10. Analiza statystyczna oraz opracowanie graficzne wyników	56
4. Wyniki.....	57
4.1. Ocena skuteczności aktywacji psich limfocytów T z wykorzystaniem mikrokulek magnetycznych MicroBeads	57

4.2.	Analiza zmian ekspresji genów związanych z wczesną aktywacją	59
4.3.	Ocena wpływu stężenia MicroBeads na poziom aktywacji oraz zdolność limfocytów T do proliferacji	60
4.4.	Ocena wpływu temperatury na skuteczność aktywacji limfocytów T	61
4.5.	Ocena wpływu aktywacji <i>in vitro</i> na indukcję apoptozy i aktywność metaboliczną psich limfocytów T, ich funkcje efektorowe oraz zdolność do nabywania fenotypu komórek pamięci efektorowej	62
4.6.	Badanie wpływu stymulacji komórek na aktywację szlaków sygnałowych...	63
4.7.	Ocena skuteczności aktywacji limfocytów T pomocniczych z wykorzystaniem mikrokulek magnetycznych EpoxyBeads	64
4.8.	Analiza różnicowania limfocytów T CD4 ⁺ w kierunku fenotypu Th17	66
4.9.	Określenie wpływu czynników modyfikujących szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina na różnicowanie psich limfocytów Th17	67
4.10.	Badanie wpływu różnicowania psich limfocytów T w kierunku fenotypu Th17 na charakterystykę fenotypu komórek pamięci	68
4.11.	Analiza aktywności metabolicznej komórek różnicowanych w kierunku fenotypu Th17	69
5.	Dyskusja.....	70
6.	Podsumowanie	84
7.	Wnioski.....	86
8.	Bibliografia	87
9.	Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu oraz oświadczenia współautorów	105

Streszczenie

Pies domowy (*Canis lupus familiaris*) stanowi wartościowy model w badaniach z zakresu immunologii i onkologii. Główne populacje komórek układu odpornościowego psów zostały dobrze scharakteryzowane i wykazują istotne podobieństwo do komórek ludzkich. Na szczególną uwagę zasługuje subpopulacja limfocytów Th17, uznawana za obiecujący element strategii terapeutycznych opartych na adoptywnej immunoterapii komórkowej. Limfocyty Th17 charakteryzują się właściwościami przypominającymi cechy komórek macierzystych oraz zwiększoną opornością na apoptozę, co pozwala im utrzymywać wysoką aktywność przeciwnowotworową nawet po długotrwałej ekspansji *ex vivo*. Niemniej jednak metody hodowli oraz różnicowania w warunkach *in vitro* limfocytów T izolowanych od psów nadal wymagają optymalizacji.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie metod aktywacji i ekspansji psich limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej oraz określenie warunków niezbędnych do różnicowania limfocytów T pomocniczych w kierunku fenotypu Th17. W tym celu opracowano protokół aktywacji *in vitro* z zastosowaniem mikrokulek magnetycznych pokrytych przeciwciałami przeciwko psim cząsteczkom CD3 i CD28, zapewniając zaangażowanie receptora limfocytów T oraz sygnał kostymulujący. Opracowano również metodykę różnicowania psich limfocytów Th17, wykorzystując pożywkę różnicującą, zawierającą w swym składzie interleukiny: IL-1 β i IL-6, transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β) oraz przeciwciało skierowane przeciwko psiej IL-4. Dodatkowo sprawdzono potencjalne zastosowanie modulatorów szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina w celu zwiększenia wydajności tego procesu.

Wykazano, że zastosowanie mikrokulek magnetycznych pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28 skutecznie indukuje aktywację psich limfocytów T w warunkach *in vitro*, a także nasila ich proliferację i różnicowanie. Optymalizacja stosunku ilościowego mikrokulek magnetycznych do limfocytów T pozwoliła na ograniczenie apoptozy, zachowanie wysokiej żywotności komórek oraz nabycie przez nie funkcji efektorowych. Co istotne, po raz pierwszy wykazano, że połączenie metody aktywacji psich limfocytów T CD4⁺ opartej na równoczesnym zaangażowaniu cząsteczek CD3 i CD28 z hodowlą w odpowiedniej pożywce różnicującej umożliwia uzyskanie wysokiego odsetka limfocytów Th17. Ponadto zastosowanie indometacyny, inhibitora szlaku Wnt/ β -katenina, wspierało proces różnicowania psich limfocytów Th17. Otrzymane komórki wykazywały fenotyp limfocytów T pamięci efektorowej oraz wysoką aktywność metaboliczną opartą na fosforylacji oksydacyjnej.

Opracowana w niniejszej pracy metoda aktywacji psich limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej umożliwia uzyskanie komórek charakteryzujących się zdolnością do proliferacji, wysoką żywotnością oraz funkcjonalnością. W trakcie badań nad różnicowaniem uzyskano najwyższy odsetek psich limfocytów Th17 opisany w dotychczasowej literaturze, co podkreśla potencjał opracowanych metod. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat biologii psich limfocytów T, a ponadto mogą w przyszłości przyczynić się do rozwoju adoptywnej immunoterapii w medycynie weterynaryjnej.

Słowa kluczowe: aktywacja limfocytów T, limfocyty Th17, mikrokulki magnetyczne, ścieżka sygnałowa Wnt/ β -katenina

Summary

The domestic dog (*Canis lupus familiaris*) represents a valuable model for research in immunology and oncology. The major populations of canine immune cells have been well characterized and show significant similarities to their human counterparts. The Th17 subpopulation of lymphocytes has recently emerged as a promising component of therapeutic strategies based on adoptive cellular immunotherapy. Th17 lymphocytes exhibit stem cell-like properties and increased resistance to apoptosis, enabling them to maintain strong antitumor activity even after long-term *ex vivo* expansion. However, the current methods for *in vitro* culture and differentiation of canine T lymphocytes still require optimization.

The aim of the study conducted as part of the doctoral dissertation was to develop methods for activation and expansion of canine T lymphocytes isolated from peripheral blood, as well as to determine the conditions required for the differentiation of helper T lymphocytes towards the Th17 phenotype. The *in vitro* activation protocol was developed based on the use of magnetic microbeads coated with antibodies against canine CD3 and CD28 molecules that ensure T cell receptor engagement and costimulatory signaling. The method for canine CD4⁺ T cell differentiation towards the Th17 phenotype was also established and employed a programming medium containing interleukins IL-1 β and IL-6, transforming growth factor beta (TGF- β), and an antibody targeting canine IL-4. Additionally, the potential use of modulators of the Wnt/ β -catenin signaling pathway was investigated to enhance the efficiency of the differentiation process.

Results obtained demonstrated that the use of magnetic microbeads coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies effectively induced *in vitro* activation of canine T lymphocytes, and promoted their proliferation and differentiation. Optimization of the ratio of microbeads to T cells minimized apoptosis, maintained high cell viability, and facilitated the acquisition of effector functions. Importantly, this study demonstrated for the first time that combining canine CD4⁺ T cell activation through simultaneous engagement of CD3 and CD28 with culture in the appropriate programming medium enables generation of a high percentage of Th17 lymphocytes. Furthermore, the use of indomethacin, an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway, supported the differentiation of canine Th17 lymphocytes. The obtained cells exhibited an effector-memory T cell phenotype and high metabolic activity based on oxidative phosphorylation.

The method of canine peripheral blood T lymphocytes activation developed in this study enables the generation of cells with strong proliferative capacity, high viability, and preserved functionality. The differentiation experiments yielded the highest proportion of canine Th17 lymphocytes reported so far, underscoring the potential of the developed methods. The obtained results expand the understanding of canine T cell biology and may contribute to the future development of adoptive immunotherapy in veterinary medicine.

Keywords: T cell activation, Th17 lymphocytes, magnetic microbeads, Wnt/ β -catenin signaling pathway

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

Publikacja 1

Szopa IM, Granica M , Bujak JK , Łabędź A , Błaszczuk M , Paulos CM , Majchrzak-Kuligowska K*: Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach, *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.604066>

* autor korespondencyjny

IF₂₀₂₁ = 8,786

MNiSW = 140 pkt

Publikacja 2

Szopa IM*, Majchrzak-Kuligowska K, Pingwara R, Kulka M, Taşdemir M, Gajewska M: A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity, *International Journal of Molecular Sciences*, 2025; 26(10):4946

<https://doi.org/10.3390/ijms26104946>

* autor korespondencyjny

IF₂₀₂₅ = 4,9

MNiSW = 140

Sumaryczny Impact Factor: 13,686

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 280 pkt

Wykaz najczęściej stosowanych skrótów

aAPC	sztuczna komórka prezentująca antygen (ang. <i>artificial antigen presenting cell</i>)
ACT	adoptywny transfer komórek (ang. <i>adoptive cell transfer</i>)
AICD	śmierć komórki indukowana aktywacją (ang. <i>activation-induced cell death</i>)
APC	komórka prezentująca antygen (ang. <i>antigen presenting cell</i>)
BCR	receptor limfocytu B (ang. <i>B cell receptor</i>)
CAR-T	limfocyt T z chimerycznym receptorem antygenowym (ang. <i>chimeric antigen receptor T cell</i>)
CCL	ligand chemokin z motywem C-C (ang. <i>C-C motif chemokine ligand</i>)
CCR	receptor chemokin z motywem C-C (ang. <i>C-C chemokine receptor</i>)
CD	antygen różnicowania (ang. <i>cluster of differentiation</i>)
ConA	konkanawalina A (ang. <i>concanavalin A</i>)
CTLA-4	antygen-4 związany z limfocyt T cytotoksycznym (ang. <i>cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4</i>)
CXCL	ligand chemokin z motywem C-X-C (ang. <i>C-X-C motif chemokine ligand</i>)
CXCR	receptor chemokin z motywem C-X-C (ang. <i>C-X-C motif chemokine receptor</i>)
DC	komórka dendrytyczna (ang. <i>dendritic cell</i>)
FBS	płodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
IFN-γ	interferon γ (ang. <i>interferon γ</i>)
IL	interleukina (ang. <i>interleukin</i>)
limfocyt T_c	limfocyt T cytotoksyczny (ang. <i>T cytotoxic cells</i>)
limfocyt T_{CM}	limfocyt T pamięci centralnej (ang. <i>central-memory T cell</i>)

limfocyt T_{EM}	limfocyt T pamięci efektorowej (ang. <i>effector-memory T cell</i>)
limfocyt T_{FH}	folikularny limfocyt T pomocniczy (ang. <i>T follicular helper cell</i>)
limfocyt T_h	limfocyt T pomocniczy (ang. <i>T helper cell</i>)
limfocyt T_{reg}	limfocyt T regulatorowy (ang. <i>T regulatory cell</i>)
MAPK	kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MFI	średnia intensywność fluorescencji (ang. <i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>major histocompatibility complex</i>)
OCR	szybkość zużycia tlenu (ang. <i>oxygen consumption rate</i>)
PBL	limfocyty krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood lymphocytes</i>)
PBMC	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	buforowany fosforanami roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PD-1	białko programowanej śmierci komórek 1 (ang. <i>programmed cell death protein 1</i>)
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
TCR	receptor limfocyty T (ang. <i>T cell receptor</i>)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor β</i>)
TNF	czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)

1. Wstęp

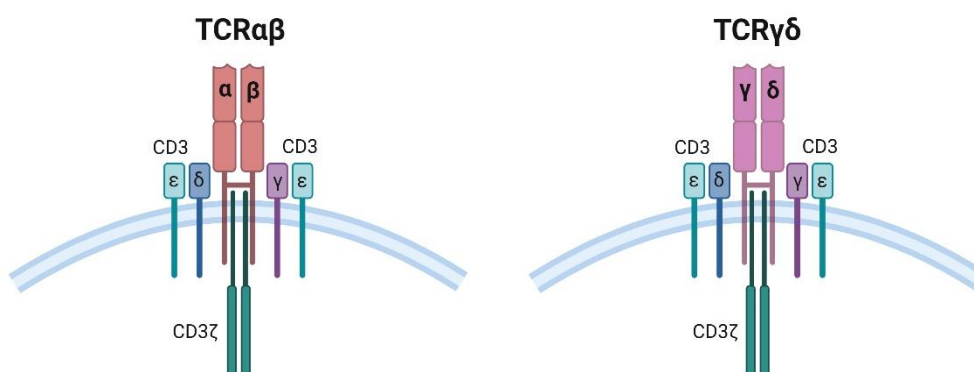
Układ odpornościowy stanowi wysoko zorganizowany i dynamicznie regulowany system komórkowych, humoralnych i molekularnych komponentów, odpowiedzialnych za rozpoznawanie i eliminację patogenów, komórek nowotworowych oraz za utrzymanie homeostazy immunologicznej organizmu. Dowodem na kluczowe znaczenie skutecznej odpowiedzi immunologicznej są liczne jednostki chorobowe, których przyczyną są zaburzenia mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie równowagi w układzie odpornościowym [1]. Zasadniczą rolę w odpowiedzi immunologicznej pełnią leukocyty, klasyfikowane na podstawie cech morfologicznych i funkcjonalnych na granulocyty oraz agranulocyty. Do granulocytów zalicza się neutrofile, eozynofile oraz bazofile, natomiast do agranulocytów – limfocyty T, limfocyty B oraz monocyty, które po migracji z krwi do tkanek różnicują w makrofagi, wykazujące zdolność fagocytozy i prezentacji antygenów. Istotne znaczenie w inicjowaniu i regulacji odpowiedzi swoistej odgrywają również inne komórki prezentujące antygen (ang. *antigen presenting cells*, APC), w tym przede wszystkim komórki dendrytyczne (ang. *dendritic cells*, DC). Ponadto funkcjonowanie komórek układu odpornościowego jest modulowane przez szeroką gamę białek regulatorowych, przede wszystkim cytokin, które warunkują koordynację i intensywność reakcji immunologicznych.

1.1. Klasyfikacja limfocytów

Limfocyty są jedną z głównych populacji komórek wchodzących w skład układu odpornościowego. Ich klasyfikacji można dokonać na podstawie kryteriów odzwierciedlających zróżnicowanie tych komórek pod względem strukturalnym oraz funkcjonalnym [1]. Zdecydowana większość limfocytów znajdujących się w organizmie to limfocyty B oraz T. Komórki te, dzięki obecności na swojej powierzchni odpowiednich receptorów – BCR (ang. *B cell receptor*) na limfocytach B oraz TCR (ang. *T cell receptor*) na limfocytach T – wykazują zdolność swoistego rozpoznawania antygenów. Ponadto, biorąc pod uwagę budowę TCR, limfocyty T można podzielić na dwie grupy: limfocyty $T\alpha\beta$ oraz $T\gamma\delta$ [2]. Znajdujący się na powierzchni tych limfocytów TCR jest heterodimerem, w skład którego wchodzi dwa łańcuchy – odpowiednio α i β lub γ i δ (Rycina 1). Każdy z nich zakotwiczony jest w błonie cytoplazmatycznej komórki dzięki krótkiemu odcinkowi przezbłonowemu i cytoplazmatycznemu. Zdecydowana większość limfocytów T to limfocyty $T\alpha\beta$,

charakteryzujące się wysoką różnorodnością łańcuchów TCR $\alpha\beta$. Jest to możliwe dzięki trzem regionom determinującym dopasowanie, nazywanym również regionami hiperzmiennymi (ang. *complementarity determining region*, CDR). Mają one kluczowe znaczenie podczas rozpoznawania epitopów, zapewniając wyjątkową czułość i swoistość TCR $\alpha\beta$ [3,4]. Zmienność TCR $\alpha\beta$, wynikająca z rekombinacji genów i redagowania receptora, pozwala limfocytom T $\alpha\beta$ na rozpoznawanie szerokiego spektrum antygenów. Dzięki temu limfocyty T $\alpha\beta$ odgrywają kluczową rolę w zwalczaniu zakażeń oraz w generowaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej [5]. Dokładny podział ze względu na różnice w funkcji limfocytów T $\alpha\beta$ został przedstawiony w kolejnych podrozdziałach.

Z kolei limfocyty T $\gamma\delta$ wykazują cechy zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej. Mogą one szybko rozpoznawać różnorodne czynniki (np. białka szoku cieplnego lub fosfoantygeny), co umożliwia szybką odpowiedź immunologiczną, nawet przy braku wcześniejszej ekspozycji na antygen. Limfocyty T $\gamma\delta$ występują licznie w obrębie błon śluzowych np. układu oddechowego, przewodu pokarmowego, a także w naskórku [6].



Rycina 1. Schemat budowy TCR oraz kompleksu CD3. Opracowanie własne.

1.1.1 Limfocyty B

Podstawową funkcją limfocytów B jest udział w prezentacji antygeny oraz odpowiedź humoralna, polegająca na syntezie antygenowo swoistych przeciwciał. W rozpoznaniu specyficznego antygeny bierze udział powierzchniowa immunoglobulina, pełniąc funkcję receptora antygenowego limfocyty B – BCR [7,8]. BCR odgrywa kluczową rolę w procesie aktywacji – tuż po związaniu antygeny uczestniczy w przekazywaniu sygnału aktywującego do wnętrza komórki. Równocześnie umożliwia

transport antygeny do wnętrza komórki, gdzie ulega on degradacji, a następnie prezentowany jest na powierzchni limfocyty B w postaci peptydów związanych z cząsteczkami głównego układu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC) klasy II [9]. Dzięki temu limfocyty B, obok komórek dendrytycznych i makrofagów, pełnią funkcję profesjonalnych APC [10]. Ponadto pobranie antygeny indukuje zwiększony poziom cząsteczek CD80 i CD86, będących ligandami dla cząsteczek kostymulujących obecnych na powierzchni limfocytów T [11]. Jednocześnie na powierzchni limfocytów B następuje wzrost poziomu receptorów dla cytokin kluczowych do tego, aby te komórki przekształciły się w plazmocyty wydzielające antygenowo swoiste przeciwciała, tj. IL-4R, IL-5R, IL-6R, TNF- α R, TGF- β R. Dzięki tym funkcjom limfocyty B aktywnie uczestniczą w indukcji i regulacji odpowiedzi immunologicznej [9,11].

Proces aktywacji limfocytów B wymaga współpracy z pomocniczymi limfocytami T (ang. *T helper cells*, Th), które dostarczają sygnałów aktywujących. Spośród sygnałów aktywujących najważniejszą rolę pełni interakcja cząsteczek CD40L, obecnych głównie na powierzchni folikularnych limfocytów T pomocniczych (ang. *T follicular helper cells*, T_{FH}), z CD40 na powierzchni limfocytów B. Dodatkowo proces ten jest kostymulowany poprzez interakcje CD80 i CD86 z CD28 na powierzchni limfocytów Th [1]. Oddziaływania tych cząsteczek powierzchniowych umożliwiają m.in. syntezę i indukcję przełączania klas przeciwciał – procesu polegającego na zmianie izotypu przeciwciał wytwarzanych przez limfocyty B, niezbędnego do rozwinięcia właściwej odpowiedzi immunologicznej [12–14]. Powyższe procesy są dodatkowo wspomagane przez cytokiny wydzielane przez limfocyty Th. Szczególną rolę odgrywa interleukina (ang. *interleukin*, IL) 21, wytwarzana przez limfocyty T_{FH}, IL-4, charakterystyczna dla odpowiedzi Th2, a także interferon gamma (ang. *interferon* γ , IFN- γ), wydzielany przez limfocyty Th1 [14,15]. Ostatecznym efektem aktywacji limfocytów B jest ich różnicowanie w kierunku komórek plazmatycznych, odpowiedzialnych za wydzielanie przeciwciał lub w komórki pamięci immunologicznej, zapewniające długotrwałą ochronę po ponownej ekspozycji na ten sam patogen [14].

1.1.2 Limfocyty T $\alpha\beta$

Limfocyty T $\alpha\beta$ uczestniczą w odpowiedzi komórkowej i pełnią różnorodne funkcje w zależności od ich podtypu. Poszczególne populacje charakteryzują się obecnością specyficznych cząsteczek powierzchniowych takich jak: CD4 lub CD8.

Są to antygeny różnicowania (ang. *cluster of differentiation*, CD), które pełnią zarówno funkcje strukturalne, jak i sygnalizacyjne. Tradycyjna funkcjonalna klasyfikacja limfocytów Tαβ opiera się na wyróżnieniu trzech głównych subpopulacji: limfocytów T pomocniczych (ang. *T helper cells*, Th), wykazujących na swej powierzchni obecność cząsteczki CD4; limfocytów T cytotoksycznych (ang. *T cytotoxic cells*, Tc), charakteryzujących się obecnością cząsteczki powierzchniowej CD8; oraz limfocytów T regulatorowych (ang. *T regulatory cells*, Treg), których błony komórkowe wykazują cząsteczki CD4 lub CD8, jak również antygen różnicowania CD25. Limfocyty Treg wykazujące cząsteczkę CD4 charakteryzują się obecnością czynnika transkrypcyjnego FoxP3 (ang. *forkhead box P3*), kluczowego dla ich funkcji immunomodulacyjnej.

Limfocyty Tc (CD8⁺) są zdolne do bezpośredniego niszczenia komórek zakażonych wewnątrzkomórkowo (wirusy, bakterie, pasożyty) oraz tych, które uległy transformacji nowotworowej, poprzez indukcję procesu apoptozy [16–18]. Pełnią funkcję efektorową odpowiedzi komórkowej na dwa różne sposoby. Po pierwsze indukcja apoptozy komórek docelowych jest możliwa dzięki obecnym w cytoplazmie ziarnistościom zawierającym związki o charakterze litycznym, które stanowią niezwykle ważny element limfocytów Tc [19]. Ziarnistości te są zmodyfikowanymi lizosomami zawierającymi dwa typy białek cytotoksycznych: proteazy serynowe (granzymy) oraz perforyny, które są wydzielane w odpowiedzi na aktywację limfocytu Tc [17,19,20]. Drugim możliwym mechanizmem jest indukcja apoptozy zależnej od interakcji cząsteczek z nadrodziny czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor*, TNF), związanych z błoną komórek efektorowych i ich receptorów obecnych na komórkach docelowych. W przypadku limfocytów Tc głównymi ligandami odpowiedzialnymi za indukcję apoptozy są FasL, TRAIL (ang. *TNF-related apoptosis inducing ligand*), TNF-α, limfotoksyna-α i TWEAK (ang. *TNF-related activation induced cytokine*). Efektem interakcji ligandów z odpowiednimi receptorami jest przekazanie do komórki docelowej sygnału indukującego proces apoptozy [17, 21–26]. Ponadto limfocyty Tc mogą również działać pośrednio, poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych, co wzmacnia lokalną odpowiedź immunologiczną [20,27]. Najważniejszymi cytokinami efektorowymi są: IFN-γ, TNF-α, oraz IL-2 [28,29]. Wydzielanie IFN-γ powoduje między innymi klasyczną aktywację makrofagów (M1), zwiększając ich zdolność do fagocytozy, wydzielania reaktywnych form tlenu i azotu oraz niszczenia czynników zakaźnych i komórek nowotworowych [28,30]. Dodatkowo indukuje wzrost poziomu cząsteczek MHC klasy I i MHC klasy II na powierzchni

komórek, co zwiększa skuteczność prezentacji antygeny i wzmacnia odpowiedź limfocytów T [29,31,32]. Podobne działanie wykazuje TNF- α , który stymuluje makrofagi i DC do wydzielania cytokin oraz zwiększa ich zdolność prezentacji antygeny. TNF- α wpływa również na śródbłonek naczyń, powodując zwiększenie jego przepuszczalności oraz wzrost poziomu cząsteczek adhezyjnych, co ułatwia migrację leukocytów do miejsca zapalenia [33]. Ponadto indukuje wzrost wydzielania cząsteczek należących do rodziny ligandów chemokin z motywem C-X-C (ang. *C-X-C motif chemokine ligand*, CXCL) i C-C (ang. *C-C motif chemokine ligand*, CCL), takich jak: CXCL9, CXCL10 i CCL5, które sprzyjają rekrutacji kolejnych leukocytów, szczególnie w obecności IFN- γ [34,35]. Z kolei IL-2 działa autokrynnie i parakrynnie na limfocyty, stymulując ich proliferację i wspierając w ten sposób odpowiedź immunologiczną [36,37].

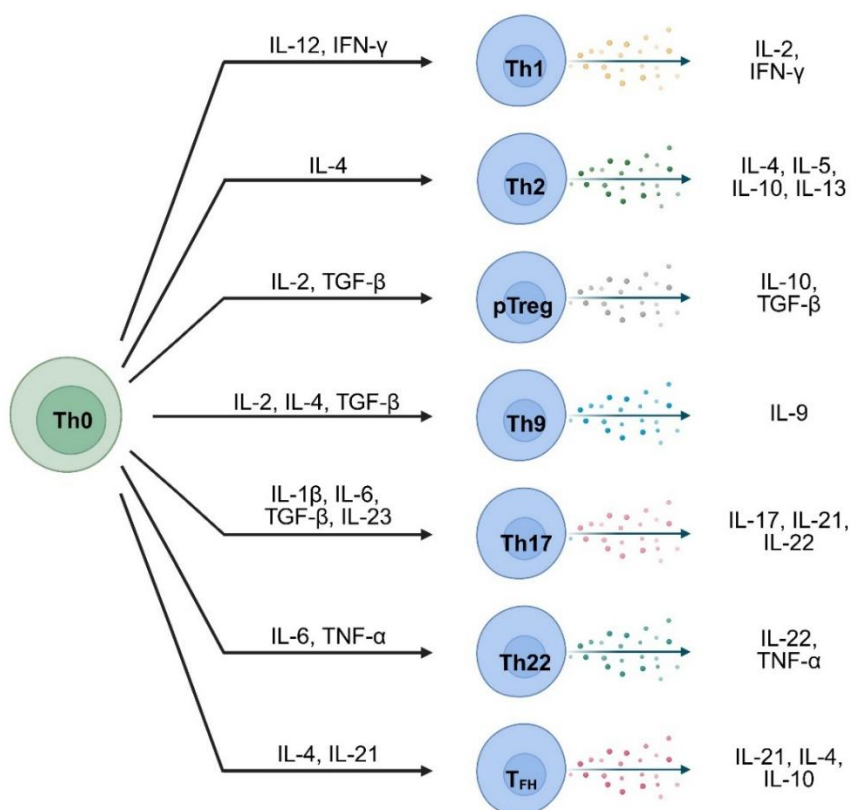
Limfocyty Th (CD4⁺) odgrywają kluczową rolę w koordynacji mechanizmów efektorowych zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej [38]. Jest to możliwe dzięki kontaktom komórka-komórka, które prowadzą do aktywacji limfocytów B oraz poprzez wydzielane przez nie cytokiny. Same limfocyty Th mogą jednak pełnić swoje funkcje dopiero po aktywacji i przekształceniu się w komórki efektorowe [39]. Aktywacja limfocytu Th zachodzi w wyniku rozpoznania swoistego antygeny prezentowanego w kontekście cząsteczki MHC klasy II przez kompleks TCR oraz CD4. Działanie komórek efektorowych jest następnie możliwe poprzez wydzielanie różnorodnych cytokin, takich jak interleukiny (np. IL-2, IL-4, IL-17) oraz IFN- γ . Działanie tych cytokin koordynuje mechanizmy efektorowe zarówno odporności wrodzonej, jak i nabytej [40]. W ten sposób limfocyty Th kontrolują między innymi aktywację i proliferację takich komórek układu odpornościowego jak: limfocyty B, limfocyty Tc, komórki NKT, NK, makrofagi czy DC. Na podstawie profilu wydzielanych cytokin oraz pełnionych funkcji, efektorowe limfocyty Th są klasyfikowane do odrębnych subpopulacji, których różnicowanie jest regulowane przez odpowiednie cytokiny i czynniki transkrypcyjne [1]. Podział limfocytów Th wraz z charakterystyką poszczególnych grup został szerzej opisany w kolejnym podrozdziale ze względu na istotność omawianego zagadnienia w kontekście niniejszej rozprawy doktorskiej.

Limfocyty Treg stanowią istotny element kontroli i homeostazy układu odpornościowego. Najlepiej poznaną grupą są komórki prezentujące charakterystyczne antygeny różnicowania, takie jak CD4 i CD25, a także wykazujące wewnątrzkomórkowy czynnik transkrypcyjny FoxP3. Poprzez wydzielanie cytokin immunosupresyjnych (np. IL-10, TGF- β) hamują one nadmierną aktywację limfocytów efektorowych

i zapobiegają rozwojowi autoagresji. Limfocyty te zapewniają utrzymanie tolerancji immunologicznej, zapobiegają rozwojowi chorób autoimmunologicznych oraz kontrolują nasilenie reakcji zapalnych. Wśród tej populacji wyróżnia się limfocyty określane jako pochodzące z grasicy tTreg (ang. *thymus-derived Treg*) oraz limfocyty nabywające funkcje regulatorowe na obwodzie, nazywane indukowalnymi pTreg (ang. *peripheral Treg*). Różnicowanie limfocytów pTreg zachodzi pod wpływem specyficznych cytokin obecnych w mikrośrodku, głównie IL-2, IL-10 oraz transformującego czynnika wzrostu beta (ang. *transforming growth factor β* , TGF- β).

1.2. Subpopulacje limfocytów T pomocniczych

Limfocyty Th są jednymi z najważniejszych komórek biorących udział w odporności swoistej. Są zaangażowane w aktywację limfocytów B i ich przekształcenie w komórki plazmatyczne zdolne do wydzielania przeciwciał, a także wspomagają aktywację cytotoksycznych limfocytów T do zabijania zakażonych komórek docelowych [1]. Po rozpoznaniu swoistego antygeny prezentowanego w kontekście MHC klasy II przez TCR i cząsteczkę CD4, dziewicze limfocyty T ulegają różnicowaniu w wyspecjalizowane komórki efektorowe. Do najważniejszych subpopulacji należą limfocyty Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T_{FH} oraz Treg, z których każda pełni odrębne funkcje w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej. Proces różnicowania limfocytów T w kierunku poszczególnych subpopulacji jest regulowany przez cytokiny oraz cząsteczki kostymulujące obecne w ich mikrośrodku [41]. Badania wykazały, że białka należące do rodziny czynników transkrypcyjnych STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*) odgrywają istotną rolę w kształtowaniu się określonego fenotypu limfocytów Th. Początkiem każdej ścieżki różnicowania są komórki Th0, czyli dziewicze limfocyty T. Na powierzchni tych komórek obecny jest receptor CD4. Th0 są zdolne do syntezy cytokin takich jak: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), jednakże w niewielkich ilościach. Po rozpoznaniu antygeny, pod wpływem odpowiednich cytokin oraz cząsteczek kostymulujących, limfocyty Th0 mogą przekształcać się w różne wyspecjalizowane subpopulacje komórek Th (Rycina 2).



Rycina 2. Schemat różnicowania limfocytów Th w kierunku określonych subpopulacji pod wpływem występujących w środowisku cytokin. Na schemacie przedstawione są również cząsteczki sygnałowe wydzielane przez konkretne subpopulacje limfocytów Th. Opracowanie własne.

Limfocyty Th1 powstają pod wpływem działania IL-12 i IFN- γ [38,42]. IFN- γ , po związaniu się ze swoim receptorem, aktywuje białko STAT1, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej syntezy IFN- γ oraz produkcji czynnika transkrypcyjnego T-bet (ang. *T-box transcription factor TBX21*) [43]. Białko T-bet pełni istotną rolę regulacyjną w procesie różnicowania limfocytów Th1, nie tylko poprzez aktywację transkrypcji genów promujących rozwój tego fenotypu, lecz także dzięki zdolności do hamowania różnicowania się przeciwnych subpopulacji komórkowych [42]. Bezpośrednio wiąże się z genem *Ifng* (kodującym IFN- γ) i aktywuje syntezę tej cytokiny. W ten sposób promuje różnicowanie limfocytów Th1, równocześnie hamując różnicowanie w kierunku Th2 [40,44]. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego STAT1 stymuluje również transkrypcję podjednostki $\beta 2$ receptora IL-12, zwiększając wrażliwość komórek Th1 na IL-12 (mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego). Ponadto IL-12, po związaniu się ze swoim receptorem, może aktywować czynnik transkrypcyjny STAT4, co w późniejszych etapach różnicowania dodatkowo wzmacnia odpowiedź limfocytów Th1 [43]. Jednocześnie w komórkach z ufosforylowaną formą T-bet dochodzi

do supresji genów kodujących IL-4 oraz czynnik transkrypcyjny GATA-3 (ang. *GATA binding protein 3*), co ogranicza różnicowanie się limfocytów w kierunku fenotypu Th2 [45,46]. Ograniczana jest również aktywność genu kodującego receptor jądrowy ROR γ t (ang. *retinoic acid-related orphan receptor gamma t*), który pełni kluczową funkcję w kształtowaniu fenotypu Th17 [47]. Limfocyty Th1 uczestniczą w rozpoznawaniu i zwalczaniu patogenów wewnątrzkomórkowych, takich jak wirusy i bakterie wewnątrzkomórkowe. Charakteryzują się wysokim poziomem wydzielania IL-2 oraz IFN- γ . IFN- γ pełni kluczową rolę w aktywacji makrofagów w procesie odpowiedzi komórkowej przeciw patogenom wewnątrzkomórkowym, jak również indukuje syntezę białek o charakterze przeciwwirusowym w trakcie zakażeń wirusami [48]. Z kolei IL-2 działa jako czynnik wzrostu dla limfocytów T, wspiera ich proliferację, stymuluje cytotoksyczność limfocytów T CD8⁺, a także odgrywa istotną rolę w tworzeniu komórek pamięci T CD8⁺ po pierwszym kontakcie z antygenem, co przyczynia się do skutecznej wtórnej odpowiedzi układu odpornościowego [42].

W procesie różnicowania limfocytów Th2 kluczową rolę odgrywa IL-4. Oddziałuje ona poprzez swoisty receptor na powierzchni komórek Th2 i powoduje translokację ufosforylowanej formy białka STAT6 do jądra i wzrost poziomu GATA-3 – najważniejszego czynnika transkrypcyjnego regulującego różnicowanie limfocytów Th2 [42]. GATA-3 wiąże się z miejscami regulatorowymi w locus genowym cytokin charakterystycznych dla komórek Th2, obejmującym geny *Il4*, *Il5* i *Il13*, co jest niezbędne do ich prawidłowej ekspresji [46]. Jednocześnie GATA-3 hamuje różnicowanie w kierunku Th1. Działanie takie ma również IL-10 wydzielana przez limfocyty Th2, która hamuje wydzielanie IFN- γ oraz innych cytokin, które wpierają różnicowanie fenotypu Th1 lub Th17 [46]. Komórki Th2 inicjują odpowiedź immunologiczną przeciwko pasożytom zewnątrzkomórkowym oraz zakażeniom bakteriami zewnątrzkomórkowymi, a także odgrywają kluczową rolę w rozwoju chorób alergicznych [42]. Limfocyty Th2 wspomagają głównie odpowiedź humoralną. Głównymi cytokinami syntetyzowanymi przez komórki Th2 są: IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13. Poprzez wydzielanie cytokin, takich jak IL-4 i IL-5, stymulują limfocyty B do przełączania klas przeciwciał, promując wydzielanie immunoglobulin IgE, uczestniczących w odpowiedzi przeciwko zarażeniom pasożytniczym i w przebiegu chorób alergicznych, oraz IgA, pełniących funkcje w obrębie błon śluzowych [49,50].

Limfocyty Th9 identyfikuje się na podstawie IL-9 wydzielanej przez nie jako głównej cytokiny efektorowej. Różnicowanie tych komórek zależy od obecności

cytokin IL-2, IL-4 i TGF- β w mikrośrodowisku [51,52]. Ponadto obecność IL-21 i TNF- α również sprzyja różnicowaniu limfocytów Th9. Wykazano, że limfocyty Th9 same są zdolne do wydzielania IL-21, która autokrynnie stymuluje ich własną syntezę IL-9, tworząc w ten sposób dodatnie sprzężenie zwrotne wspierające zarówno ich różnicowanie, jak i funkcje efektorowe [53]. Komórki Th9 i wydzielana przez nie IL-9 były początkowo opisywane jako odgrywające rolę w alergiach i zarażeniach pasożytniczych, ze względu na zdolność do regulacji komórek układu odpornościowego, takich jak komórki tuczne, eozynofile oraz limfocyty B. Późniejsze badania wykazały, że IL-9 wpływa również na inne komórki układu odpornościowego, sprzyjając rozwojowi stanu zapalnego, co może prowadzić do reakcji o charakterze autoimmunologicznym [54]. Warto zaznaczyć, że dokładna rola tych komórek prawdopodobnie zależy od mikrośrodowiska oraz od obecności innych cytokin wydzielanych przez limfocyty Th [55]. W ostatnich latach wykazano, że komórki Th9 mogą być skuteczne w wywoływaniu przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej oraz hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych [56]. Wykazywały one silne właściwości przeciwnowotworowe w modelach takich nowotworów jak czerniak, rak jelita grubego oraz rak gruczołu sutkowego [57–59]. Ich aktywność opiera się między innymi na działaniu IL-9 oraz IL-21, które wzmacniają cytotoksyczną odpowiedź limfocytów T CD8⁺ oraz wspierają rekrutację DC prezentujących antygen [60].

Subpopulacja limfocytów Th22 została opisana w 2009 roku jako limfocyty T CD4⁺, które wydzielają głównie IL-22, ale także IL-13, IL-26 i TNF- α . Jednocześnie wykazują obecność receptorów chemokin z motywem C-C (ang. *C-C chemokine receptor*, CCR), takich jak CCR4, CCR6 oraz CCR10 [61–63]. Pomimo że IL-22 jest także wytwarzana przez limfocyty Th1 i Th17, cechą charakterystyczną pozwalającą odróżnić limfocyty Th22 jest brak syntezy IFN- γ , IL-4 czy IL-17 [64,65]. Ponadto limfocyty Th22 wykazują stabilność fenotypową nawet w warunkach sprzyjających różnicowaniu się w kierunku Th1, Th2, Th17 czy Treg, co dodatkowo potwierdza, że Th22 stanowią odrębną populację efektorowych limfocytów T [65,66]. Funkcja komórek Th22 jest regulowana przez czynnik transkrypcyjny AHR (ang. *aryl hydrocarbon receptor*), którego obecność indukuje syntezę IL-22. Wytwarzanie AHR jest stymulowane przez cytokiny takie jak TNF- α i IL-6 [67]. Limfocyty Th22 występują w dużych ilościach w skórze i odgrywają istotną rolę w gojeniu ran skóry, a także wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe

[66]. Coraz więcej badań wskazuje na ich istotną rolę w rozwoju alergii, chorób autoimmunologicznych oraz nowotworów [62,68,69].

Limfocyty T_{FH} stanowią wyspecjalizowaną podgrupę limfocytów T $CD4^+$, charakteryzującą się obecnością receptora chemokin z motywem C-X-C typu 5 (ang. *C-X-C motif chemokine receptor 5*, CXCR5) oraz zdolnością do syntezy IL-21, a także innych cytokin takich jak: IL-4, IFN- γ , IL-10 czy IL-2 [70]. Ich główną funkcją jest wspieranie aktywacji, różnicowania oraz dojrzewania limfocytów B w obrębie ośrodków rozmnażania narządów limfatycznych [71]. Obecność CXCR5 umożliwia limfocytom T_{FH} migrację do grudek chłonnych, gdzie pełnią one swoje funkcje efektorowe [72]. Kluczowe znaczenie w tym procesie ma oddziaływanie cząsteczek CD40, obecnych na powierzchni limfocytów B, z CD40L znajdującymi się na limfocytach T_{FH} . Interakcja tych komórek jest niezbędna do przeżycia limfocytów B w ośrodkach rozmnażania oraz do ich różnicowania w limfocyty B pamięci [70]. Natomiast IL-21, oprócz silnej stymulacji proliferacji i różnicowania limfocytów B pamięci, dodatkowo wspiera różnicowanie limfocytów B w komórki plazmatyczne wydzielające przeciwciała [70,71]. Charakterystyczną cechą limfocytów T_{FH} jest ich plastyczność, czyli zdolność do przekształcania się w subpopulacje komórek o właściwościach charakterystycznych m.in. dla limfocytów Th1, Th2 lub Th17, określane odpowiednio jako T_{FH1} , T_{FH2} , T_{FH17} . Fenotyp limfocytów ulega przekształceniu w zależności od cytokin obecnych w mikrośrodowisku [73,74]. Pomimo obecności czynnika transkrypcyjnego Bcl-6, limfocyty T_{FH} charakteryzują się zdolnością do wytwarzania czynników transkrypcyjnych T-bet, GATA-3 i ROR γ t, co umożliwia przekształcenie ich fenotypu [74]. W przebiegu infekcji wirusowych limfocyty T_{FH} mogą przekształcać się w subpopulację T_{FH1} i wydzielać IFN- γ , natomiast podczas zarażeń pasożytniczych mogą różnicować się w limfocyty T_{FH2} syntetyzujące IL-4 i IL-13 [73]. Z kolei limfocyty T_{FH17} są odpowiedzialne za stymulację wytwarzania przeciwciał IgA [74,75].

1.3. Limfocyty Th17

Limfocyty Th17 stanowią subpopulację limfocytów T pomocniczych, jednak ze względu na tematykę rozprawy doktorskiej ich charakterystyka została szerzej opisana w osobnym podrozdziale. Komórki te zostały zidentyfikowane w 2005 roku jako komórki wytwarzające IL-17A i IL-17F. Ponadto limfocyty Th17 mają zdolność do syntezy IL-22, IL-23, IL-21, IL-26 oraz CCL-20 [76]. Limfocyty Th17 wykazują obecność receptora jądrowego ROR γ t, który jest głównym białkiem regulującym

różnicowanie w kierunku fenotypu Th17 [77,78]. Limfocyty Th17, podobnie jak inne subpopulacje, wymagają specyficznego mikrośrodowiska cytokinowego do swojego różnicowania [79]. Mimo że różni się ono pomiędzy mysimi i ludzkimi limfocytami Th17, to u obu gatunków najważniejszą cytokiną biorącą udział w różnicowaniu jest TGF- β [80]. Na początkowym etapie polaryzacji mysie limfocyty T wymagają obecności nie tylko TGF- β , ale również IL-6. W kolejnym etapie IL-21 wspomaga proliferację mysich limfocytów Th17 [78,81]. Z kolei do indukcji różnicowania ludzkich komórek Th17 wystarcza kombinacja TGF- β i IL-21, a IL-1 β i IL-6 są kluczowe dla dalszej proliferacji tych komórek [82]. Ostatnim etapem różnicowania limfocytów jest utrzymanie ich fenotypu. Stabilizacja fenotypu zarówno mysich, jak i ludzkich limfocytów Th17 jest możliwa dzięki działaniu IL-23 [78,83]. Pomimo że wcześniejsze etapy różnicowania nie wymagają IL-23, cytokina ta wspiera późniejszą proliferację, przeżywalność i stabilność cech komórek Th17 [84]. Dlatego też jest ona kluczowa dla długoterminowego różnicowania limfocytów Th17 w hodowlach *in vitro* [85]. Obecność IL-6, IL-21, a w późniejszych etapach również IL-23, aktywuje białko STAT3. Fosforylowany czynnik transkrypcyjny STAT3 (pSTAT3) wiąże się z regionami promotorowymi i aktywuje transkrypcję genów kodujących białka regulujące różnicowanie limfocytów Th17. Są nimi geny: *rorc* – kodujący główny czynnik transkrypcyjny komórek Th17, ROR γ t – oraz *rora* – kodujący czynnik transkrypcyjny ROR α , który jest zaangażowany w różnicowanie komórek Th17 w mniejszym stopniu niż ROR γ t [77,86,87]. Podstawowy czynnik transkrypcyjny typu ATF z suwakiem leucynowym (ang. *basic leucine zipper ATF-like transcription factor*, BATF) oraz czynnik regulujący interferon typu 4 (ang. *interferon regulatory factor 4*, IRF4) tworzą funkcjonalny kompleks wspólnie z białkami pSTAT3, ROR γ t i ROR α , który aktywuje ekspresję genów kodujących cytokiny charakterystyczne dla subpopulacji Th17, między innymi IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22 [86,88,89]. Fosforylacja białka STAT3 indukowana przez IL-6 zwiększa również poziom receptora IL-23 (IL-23R), co podnosi wrażliwość różnicujących się limfocytów Th17 na działanie IL-23 [86]. IL-1 β to kolejna kluczowa cytokina wspierająca różnicowanie limfocytów Th17 poprzez aktywację białka p38 należącego do kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) oraz szlaku sygnałowego Akt/mTOR. IL-1 β indukuje również powstawanie IRF4, który bezpośrednio zwiększa wydzielanie IL-21 [90]. Z drugiej strony, TGF- β pośrednio wspiera polaryzację limfocytów Th17 poprzez hamowanie różnicowania subpopulacji Th1 i Th2. Mechanizm

ten angażuje białka z rodziny Smad, za pośrednictwem których przekazywane są sygnały ograniczające ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne T-bet, GATA-3 oraz inne czynniki związane z różnicowaniem limfocytów Th1 i Th2 [91–93]. Warto również zaznaczyć, że synteza cytokin efektorowych przez limfocyty Th17 wiąże się ze zmianami epigenetycznymi w regionach promotorowych odpowiednich genów. Sygnalizacja indukowana przez TGF- β i IL-6 prowadzi do acetylacji histonów w promotorach genów *il17a* i *il17f*, co zwiększa dostępność chromatyny dla czynników transkrypcyjnych i wspomaga transkrypcję tych genów [94].

Główną funkcją limfocytów Th17 jest udział w mechanizmach obronnych organizmu zwłaszcza podczas zakażeń bakteryjnych i grzybiczych błon śluzowych przewodu pokarmowego i dróg oddechowych [95,96]. Są one kluczowym elementem odpowiedzi odpornościowej przeciwko bakteriom, takim jak *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter rodentium*, a także *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. [97,98] oraz przeciwko grzybom, na przykład *Candida albicans* [99]. Wytwarzane przez limfocyty Th17 cytokiny IL-17A i IL-17F oddziałują z receptorami IL-17R obecnymi na komórkach nabłonkowych, fibroblastach i komórkach śródbłonna. To prowadzi do wydzielania prozapalnych cytokin i chemokin (m.in. CXCL1, CXCL6, CXCL8), a w efekcie do migracji neutrofilów do miejsca zapalenia oraz ich aktywacji. Dodatkowo indukują one wytwarzanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych (ang. *antimicrobial peptides*, AMP), bezpośrednio wzmacniając mechanizmy obronne organizmu [83,97,100,101]. IL-22 wydzielana przez limfocyty Th17 wpływa na komórki nabłonka, zwiększając wytwarzanie AMP (np. β -defensyn) oraz wspierając regenerację tkanek po uszkodzeniu [102,103]. Dzięki temu komórki Th17 pełnią istotną rolę w utrzymaniu bariery śluzówkowej i umożliwiają szybką odpowiedź na zakażenie bakteryjne i grzybicze [103–106]. Warto podkreślić, że w warunkach fizjologicznych limfocyty Th17 wykazują tzw. fenotyp niepatogeny. Ich rola ogranicza się do zapewnienia ochrony immunologicznej bez nadmiernego uszkodzania tkanek. Kluczowe dla utrzymania tej homeostazy są obecność TGF- β i brak IL-23 w mikrośrodowisku, a także równowaga pomiędzy limfocytami Th17 a Treg [107]. Badania nad komórkami Th17 pochodzącymi z różnych tkanek wykazały, że mogą one charakteryzować się odmiennymi wzorcami ekspresji genów, odzwierciedlającymi pełnioną rolę – utrzymania homeostazy lub chorobotwórczą [108,109]. Określone warunki mikrośrodowiska, takie jak przewlekłe zapalenie, obecność IL-23 i brak TGF- β sprzyjają przekształceniu limfocytów Th17 w tzw. fenotyp patogeny [110].

Charakteryzuje się on zwiększoną syntezą IL-17 i GM-CSF [111]. Najnowsze badania wykazały, że zarówno IL-17 i GM-CSF, jak również IL-23 przyczyniają się do patogenego działania limfocytów Th17 w przebiegu chorób autoimmunologicznych. Zwiększone wydzielanie IL-17A i GM-CSF nasila syntezę chemokin, co prowadzi do nadmiernej infiltracji neutrofilów oraz aktywacji APC, a w konsekwencji do uszkodzenia tkanek [112,113]. Zaangażowanie limfocytów Th17 zostało potwierdzone w przebiegu wielu chorób autoimmunologicznych, między innymi takich jak: stwardnienie rozsiane [114], reumatoidalne zapalenie stawów [115], nieswoiste zapalenie jelit [116], toczeń rumieniowaty układowy [117,118], łuszczyca [119] oraz astma [120].

Bardzo istotnym aspektem funkcjonowania limfocytów Th17 jest ich plastyczność fenotypowa. W odróżnieniu od subpopulacji Th1 i Th2, limfocyty Th17 mogą przekształcać się w inne subpopulacje pomocniczych limfocytów T, szczególnie w warunkach niedoboru limfocytów lub nasilonego stanu zapalnego [121,122]. Opisano kilka różnych ścieżek przekształcenia fenotypu komórek Th17 w inne populacje efektorowe, takie jak grudekowe limfocyty T_{FH} lub limfocyty Treg [123,124]. W kontekście rozwoju chorób autoimmunologicznych szczególne znaczenie ma mechanizm przekształcenia limfocytów Th17 w komórki wydzielające dodatkowo IFN- γ . Określa się je jako limfocyty Th17 o cechach charakterystycznych dla Th1 (IL-17⁺IFN- γ ⁺). Kolejna forma przekształcenia fenotypowego polega na utracie zdolności do syntezy IL-17, przy jednoczesnym wytwarzaniu IFN- γ (IL-17⁻IFN- γ ⁺), co definiuje tzw. komórki Th1-podobne pochodzenia Th17 (ang. *Th1-like exTh17 cells*) [122,125,126]. Mechanizm prowadzący do zmiany fenotypu w kierunku komórek wytwarzających IFN- γ znacząco wpływa na rozwój chorób autoimmunologicznych [127]. Limfocyty wydzielające zarówno IL-17, jak i IFN- γ charakteryzują się zwiększoną zdolnością do aktywacji makrofagów i DC, co prowadzi do nasilenia odpowiedzi zapalnej i utrzymania przewlekłego stanu zapalnego. Komórki o takiej charakterystyce zostały zidentyfikowane w ogniskach zapalnych u pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane [128,129] oraz reumatoidalne zapalenie stawów [130,131]. U pacjentów chorujących na stwardnienie rozsiane wykazano, że limfocyty Th17 o cechach charakterystycznych dla Th1 mają zwiększoną zdolność do przechodzenia przez barierę krew-mózg, a ich obecność związana jest z cięższym przebiegiem choroby [129]. Dodatkowo IFN- γ może nasilać stan zapalny, sprzyjać uszkodzeniom tkanek oraz potencjalnie osłabiać skuteczność niektórych terapii [132].

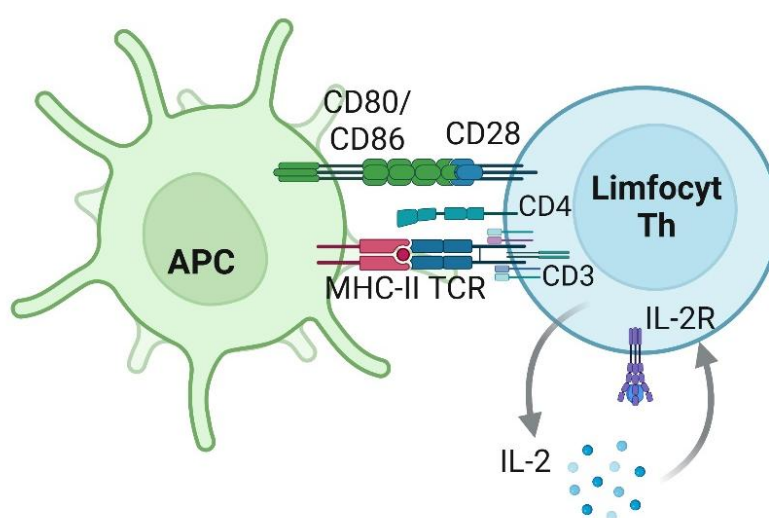
Podobne procesy przekształcenia fenotypu limfocytów Th17 zaobserwowano również w mikrośrodku nowotworowym. Rola tych komórek w procesie rozwoju nowotworów nadal pozostaje niejednoznaczna. Liczne badania wskazują, że funkcje limfocytów Th17 mogą zależeć od wielu czynników mikrośrodku [133,134]. Komórki te mogą sprzyjać progresji nowotworu poprzez promowanie angiogenezy oraz działanie immunosupresyjne. Z drugiej strony, mogą one uczestniczyć w odpowiedzi przeciwnowotworowej, zwłaszcza w przypadku przekształcania się w limfocyty Th17 o cechach charakterystycznych dla Th1. Synteza IFN- γ dodatkowo sprzyja infiltracji mikrośrodku przez komórki NK i limfocyty T CD8⁺ oraz prowadzi do wzmocnienia ich cytotoksycznego działania [134,135]. Obecnie wiele badań skupia się na wyjaśnieniu przeciwstawnej roli, jaką limfocyty Th17 odgrywają w rozwoju i progresji nowotworów [136]. Zagadnienie to jest szczególnie istotne w kontekście doniesień wykazujących, że limfocyty Th17 mogą stanowić obiecujący element strategii terapeutycznych opartych na adoptywnej immunoterapii komórkowej. Zastosowanie w adoptywnym transferze komórkowym (ang. *adoptive cell transfer*, ACT) limfocytów Th17 prowadzi do uzyskania wyraźnie wyższej skuteczności eliminacji nowotworu w porównaniu z komórkami Th1 i Th2, co zostało wykazane w mysim modelu czerniaka [137–139]. Ponadto limfocyty Th17 charakteryzują się zdolnością do długotrwałego podtrzymywania odpowiedzi przeciwnowotworowej oraz zapewnienia ochrony przed nawrotem choroby, w tym przed przerzutami do płuc [140]. Badania wskazują, że efekt ten jest powiązany z charakterystycznymi właściwościami przypominającymi cechy komórek macierzystych (w tym ekspresję genów takich jak *Tcf7* i *CTNBI*, kodującego β -kateninę) oraz zwiększoną opornością na apoptozę, co umożliwia limfocytom Th17 zachowanie silnej aktywności przeciwnowotworowej nawet po długotrwałej ekspansji *ex vivo* [139–141]. Ponadto potwierdzona została skuteczność protokołów różnicowania ukierunkowanych na uzyskanie limfocytów Th17 wydzielających IFN- γ , które wykazują większą zdolność migracji do mikrośrodku nowotworowego, powodują wzmożoną rekrutację limfocytów T CD8⁺ i komórek NK oraz silniejszy efekt przeciwnowotworowy niż klasyczne limfocyty Th1 lub limfocyty T CD8⁺ [142,143]. Z perspektywy zastosowań klinicznych cechy te czynią z limfocytów Th17 szczególnie interesującą subpopulację limfocytów T w kontekście nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych. Ich wysoka plastyczność fenotypowa, zdolność do długotrwałego przetrwania w organizmie oraz silna aktywność efektorowa sugerują, że mogą one pełnić rolę nie tylko w eliminacji komórek nowotworowych,

ale także w zapobieganiu nawrotom choroby. Dodatkowo, możliwość modyfikacji ich funkcji w warunkach *ex vivo* otwiera perspektywy personalizowanej immunoterapii komórkowej, dostosowanej do indywidualnych cech nowotworu pacjenta [144].

1.4. Aktywacja limfocytów T_{H}

Przebieg prawidłowej odpowiedzi immunologicznej opiera się na sekwencji wzajemnie powiązanych i precyzyjnie regulowanych procesów. Jednym z kluczowych jest aktywacja limfocytów T_{H} – złożony i wieloetapowy proces zachodzący głównie w węzłach i grudkach chłonnych [145]. Pierwotna aktywacja limfocytów T stanowi punkt zwrotny w odpowiedzi nabytej, determinując zarówno kierunek, jak i intensywność reakcji immunologicznej. W warunkach optymalnej stymulacji, proces ten prowadzi do proliferacji limfocytów T i ich różnicowania w określone fenotypy efektorowe [3,146].

W pierwszym etapie aktywacji limfocytów T_{H} antygeny są przetwarzane wewnątrz APC, a powstałe epitopy ulegają połączeniu z cząsteczkami MHC, tworząc kompleksy MHC-peptyd prezentowane na ich powierzchni [147,148]. Obecność tych kompleksów umożliwia rozpoznanie prezentowanego antygeny przez limfocyty T_{H} , które nawiązują krótkotrwałe interakcje z kolejnymi APC [147,148]. Wyjątkowa swoistość $TCR\alpha\beta$ umożliwia selektywne rozpoznanie prezentowanego antygeny i jego związanie, co stanowi najważniejszy element aktywacji limfocytów T_{H} . Takie połączenie inicjuje pierwszy sygnał aktywacji, uruchamiający molekularną kaskadę sygnałową w komórce [147–149].



Rycina 3. Schemat przedstawiający mechanizm aktywacji limfocytu T pomocniczego. Opracowanie własne.

Kontakt limfocyту T z APC jest dynamicznym procesem, który prowadzi do powstania synapsy immunologicznej, czyli obszaru połączenia APC i limfocyту T (Rycina 3). Synapsa immunologiczna umożliwia bezpośrednie oddziaływanie prezentowanego epitopu w kontekście białek MHC z TCR [148]. W jej strukturze można wyodrębnić trzy obszary kompleksów cząsteczek (ang. *supramolecular activation complex*, SMAC), które odgrywają kluczową rolę zarówno w procesie adhezji komórkowej, jak i przekazywaniu sygnału aktywującego. W centralnej części synapsy immunologicznej (ang. *central supramolecular activation complex*, cSMAC) znajdują się TCR, które połączone są w błonie komórkowej limfocyту T z sześcioma łańcuchami cząsteczki CD3 (dwa łańcuchy ϵ , dwa łańcuchy ζ oraz po jednym γ i δ) (Rycina 1). Komponenty kompleksu CD3 biorą udział w przekazywaniu sygnału aktywującego do wnętrza komórki po rozpoznaniu antygeny. Ponadto w centrum synapsy immunologicznej znajdują się cząsteczki kostymulujące i ich ligandy, cząsteczki CD4 lub CD8, kompleksy MHC-peptyd oraz białka przekąźnikowe takie jak kinazy LCK (ang. *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) [148,150,151]. Bardziej na zewnątrz synapsy immunologicznej znajduje się peryferyjny pierścień cząsteczek (ang. *peripheral supramolecular activation complex*, pSMAC), których funkcją jest stabilizacja oraz utrzymywanie adhezji pomiędzy APC a limfocytem T. Zlokalizowane są tutaj cząsteczki adhezyjne LFA-1 (ang. *lymphocyte function-associated antigen 1*) i VLA-1 (ang. *very late antigen 1*), białka ADAP (ang. *adhesion and degranulation-promoting adapter protein*) oraz talina. Najbardziej peryferycznie zlokalizowany jest pierścień dystalny (ang. *distal supramolecular activation complex*, dSMAC), gdzie znajdują się elementy hamujące przekazywanie sygnału takie jak fosfatazy i cząsteczki CD43, CTLA-4 (ang. *cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*) i PD-1 (ang. *programmed cell death protein 1*) [152]. Synapsa immunologiczna reguluje aktywację limfocyту T. Poprzez skupienie kluczowych czynników w określonej przestrzeni, umożliwia ona ciągłą transdukcję sygnału do wnętrza limfocyту T, nawet przy niskim stężeniu antygeny [147,150–153].

Ponieważ kompleks TCR nie wykazuje aktywności enzymatycznej, w procesie inicjacji sygnału kluczowe znaczenie mają domeny wewnątrzkomórkowe koreceptorów CD4 lub CD8, wiążące cytoplazmatyczną kinazę tyrozynową LCK. Enzym ten odgrywa zasadniczą rolę we wczesnych etapach przekazywania sygnału, katalizując fosforylację reszt tyrozynowych w sekwencjach ITAM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), obecnych w cytoplazmatycznych częściach łańcuchów CD3

(zwłaszcza w obrębie łańcuchów ζ) [4,154]. Fosforylowane reszty tyrozynowe w obrębie sekwencji ITAM tworzą miejsca przyłączania kinaz ZAP-70 (ang. *zeta-chain-associated protein kinase 70*), które po związaniu ulegają aktywacji poprzez kolejną fosforylację zależną od LCK. Następnie aktywne formy kinaz ZAP-70 fosforylują białko adaptorowe LAT (ang. *linker for activated T cells*), umożliwiając utworzenie na nim miejsc wiążących inne białka adaptorowe i efektorowe, co zapoczątkowuje dalsze etapy ścieżek sygnałowych koniecznych do prawidłowej aktywacji limfocytów $T\alpha\beta$ [155–158]. W dalszych etapach aktywacji ważną rolę pełnią białka zaangażowane w przekazywanie sygnałów z receptorów powierzchniowych w głąb komórki: GADS (ang. *Grb2-related adaptor downstream of She*), GRB2 (ang. *growth factor receptor-bound protein 2*), SLP-76 (ang. *SH2-containing leukocyte protein*) oraz ADAP. Ich działanie prowadzi do rekrutacji i aktywacji efektorowych cząsteczek sygnałowych, takich jak: PLC γ 1 (ang. *phospholipase C gamma 1*), ITK (ang. *tyrosine-protein kinase*), VAV1 oraz SOS1 (ang. *son of seven-less homolog 1*) [3,155]. Każda z wymienionych cząsteczek uczestniczy w regulacji odrębnych procesów komórkowych. Na przykład białko VAV1 indukuje przebudowę cytoszkieletu, natomiast PLC γ 1 bierze udział w hydrolizie fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu [PI(4,5)P₂], prowadząc do powstania dwóch wtórnych przekaźników – trifosforanu inozytoli (ang. *inositol trisphosphate*, IP₃) i diacyloglicerolu (ang. *diacylglycerol*, DAG). IP₃ oraz DAG odgrywają kluczową rolę w procesie napływu wapnia do cytoplazmy, a także w aktywacji kolejnych komponentów szlaków sygnałowych, takich jak: kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*, PKC), kalcyneuryna oraz MAPK [3,155,159]. Uruchomienie tych wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych powoduje w konsekwencji aktywację i translokację do jądra komórkowego kluczowych czynników transkrypcyjnych: NF- κ B (ang. *nuclear factor κ B*), NFAT (ang. *nuclear factor of activated T cells*) oraz AP-1 (ang. *activator protein 1*), które inicjują ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną [155].

W trakcie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej swoiste rozpoznanie antygeny przez TCR $\alpha\beta$ odgrywa kluczową rolę we wstępnej fazie aktywacji limfocyta T, jednak nie jest ono wystarczające do pełnego uruchomienia odpowiedzi komórkowej [160]. Niezbędny w tym procesie jest sygnał 2, który może mieć charakter kostymulujący lub hamujący. Sygnał ten jest wynikiem interakcji pomiędzy powierzchniowymi białkami APC a odpowiadającymi im ligandami znajdującymi się na limfocytach T. W sygnalizacji kostymulującej mogą brać udział następujące cząsteczki: CD28, 4-1BB, OX40 oraz ICOS [151]. Najważniejszą z nich jest CD28, której obecność występuje nawet

na limfocytach T w stanie spoczynku, co podkreśla jej pierwszoplanową rolę [161]. Częsteczki kostymulujące, w tym również CD28, obecne na limfocytach T oddziałują z ligandami CD80 i CD86 zlokalizowanymi na APC, co istotnie wspiera aktywację limfocytów T (Rycina 3). Proces ten polega na transdukcji sygnału do wnętrza komórki, w efekcie czego dochodzi do rekrutacji szeregu białek sygnałowych i kinaz (m.in. PI3K, GRB2 oraz RAS), prowadząc do aktywacji szlaku PI3K/Akt [160]. Kostymulacja na drodze interakcji CD28 z CD80 i CD86 skutkuje około 50-krotnym zwiększeniem syntezy IL-2, zarówno poprzez mechanizmy na poziomie transkrypcji genu, jak i modyfikacje potranskrypcyjne [162]. Ponadto oddziaływanie to wpływa korzystnie na przeżywalność aktywowanych limfocytów T, m.in. poprzez indukcję powstawania białek antyapoptotycznych (takich jak Bcl-X_L) [163]. Brak sygnału kostymulującego podczas połączenia TCR z kompleksem MHC-peptyd prowadzi do anergii dziewiczych limfocytów T oraz prowadzi do śmierci komórek podczas ich restymulacji [160,164].

Przykładem cząsteczki pełniącej rolę negatywnego regulatora odpowiedzi immunologicznej jest CTLA-4. Wykazuje ona wysoką homologię w stosunku do cząsteczki CD28, co sprawia, że posiada również zdolność do wiązania się z ligandami CD80 i CD86 obecnymi na powierzchni APC [147,165]. Ponadto powinowactwo CTLA-4 do CD80 i CD86 jest około 40-100-krotnie większe niż w przypadku CD28 [165]. Związanie cząsteczki CTLA-4 prowadzi do wyparcia CD28, a w konsekwencji do zahamowania aktywacji limfocyty T, co jest istotnym mechanizmem w trakcie wygaszania odpowiedzi immunologicznej [147,151,165,166]. Drugim istotnym receptorem o działaniu hamującym jest PD-1. Cząsteczka ta występuje na powierzchni aktywowanych limfocytów T i B, a także na powierzchni monocytów, a jej ligandami są PD-L1 (CD274) oraz PD-L2 (CD273) [167]. PD-1 zawiera w swojej cytoplazmatycznej części motyw ITIM (ang. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), który odpowiada za przekazywanie sygnałów hamujących z udziałem fosfataz z rodziny SHP (ang. *SRC homology region 2 domain-containing phosphatase*). Poprzez ograniczanie proliferacji limfocytów T oraz syntezy cytokin, PD-1 odgrywa istotną rolę w tłumieniu odpowiedzi efektorowej limfocytów T [167,168].

Prawidłowa proliferacja limfocytów T wymaga nie tylko rozpoznania antygeny i sygnałów kostymulujących, ale również obecności cytokin stanowiących tzw. sygnał 3 aktywujący. Szczególne znaczenie w tym procesie ma IL-2 – cytokina o działaniu pleiotropowym, wytwarzana w odpowiedzi na aktywację antygenową (Rycina 3) [169,170]. Limfocyty T po otrzymaniu 1 i 2 sygnału aktywującego wykazują zwiększony

poziom receptora interleukiny 2 (IL-2R), który jest zbudowany z trzech odrębnych podjednostek: α (CD25), β (CD122) i γ (CD132) [171]. Obecność podjednostki CD25, będącej jednym z głównych markerów aktywacji limfocytów T, jest indukowana w odpowiedzi na aktywację przez TCR oraz działanie IL-2, tworząc mechanizm dodatniego sprzężenia zwrotnego, który wzmacnia proliferację komórek [170]. Sygnał przekazywany za pośrednictwem IL-2 oraz jej receptorów inicjuje aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych, takich jak JAK-STAT, PI3K-AKT oraz MAPK, które odgrywają kluczową rolę w procesach proliferacji, ekspansji klonalnej oraz różnicowania limfocytów T w komórki efektorowe. W ten sposób IL-2 odgrywa kluczową rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, będąc głównym czynnikiem wzrostu limfocytów T, a także uczestnicząc w różnicowaniu komórek efektorowych [172,173].

1.5. Aktywacja limfocytów T $\alpha\beta$ w warunkach *in vitro*

Od momentu poznania podstawowych funkcji limfocytów T, komórki te stały się przedmiotem intensywnych badań, zwłaszcza w kontekście opracowywania nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych. Ich stosunkowo łatwa izolacja z krwi obwodowej pacjenta, zdolność do proliferacji w warunkach *in vitro* oraz wysoka podatność na modyfikacje genetyczne sprawiają, że stanowią one niezwykle cenne narzędzie zarówno w badaniach podstawowych, jak i w zastosowaniach klinicznych. Jednym z najbardziej obiecujących podejść terapeutycznych wykorzystujących limfocyty T jest adoptywny transfer komórek. Procedura ta obejmuje izolację limfocytów T od pacjenta, ich modyfikację oraz proliferację *ex vivo*. Celem modyfikacji w warunkach *in vitro* jest uzyskanie przez limfocyty T właściwości, które pozwolą na selektywną eliminację komórek nowotworowych po ponownym podaniu do organizmu pacjenta [174–178]. Uzyskanie dużej liczby limfocytów T swoistych względem antygenów nowotworowych wymaga długotrwałej hodowli *ex vivo*, opartej na intensywnej proliferacji tych komórek. Kluczowe znaczenie w tym procesie ma skuteczna aktywacja limfocytów T, warunkująca zarówno ich dalszą proliferację, jak i nabycie funkcji efektorowych. Z tego względu wybór optymalnej metody stymulacji limfocytów T w warunkach *in vitro* stanowi niezwykle istotny etap całej procedury [179,180].

Jedną z metod aktywacji limfocytów T w warunkach *ex vivo* jest wykorzystanie różnych typów APC [181]. W niektórych protokołach ekspansji ludzkich limfocytów T

wykorzystuje się naturalne komórki dendrytyczne pozyskiwane od pacjentów, generowane z monocytów krwi obwodowej. Innym powszechnie stosowanym podejściem jest użycie nieśmiertelnych ludzkich komórek erytroleukemicznych linii K562, które pełnią funkcję sztucznych komórek prezentujących antygen (ang. *artificial antigen presenting cell*, aAPC) [181]. Komórki K562 wykazują obecność cząsteczek adhezyjnych, które umożliwiają tworzenie synapsy immunologicznej i przekazywanie sygnału aktywującego. Ponadto komórki te mogą być genetycznie modyfikowane w celu prezentacji różnych cząsteczek kostymulujących oraz wydzielania cytokin [182].

Inną stosowaną strategią jest jednoczesna stymulacja cząsteczek CD3 oraz CD28 za pomocą swoistych przeciwciał monoklonalnych. Przeciwciała te mogą być stosowane zarówno w postaci rozpuszczonej, jak i zakotwiczone na różnych nośnikach, co ma na celu lepsze odwzorowanie fizjologicznych warunków aktywacji limfocytów T [183,184]. Wykazano, że stymulacja za pomocą przeciwciał w formie unieruchomionej wywołuje silniejszą odpowiedź aktywacyjną w porównaniu z ich formą rozpuszczalną [185]. Wykorzystuje się w tym celu płytki hodowlane pokryte przeciwciałami, jak również trójwymiarowe nośniki, takie jak kulki magnetyczne lub polistyrenowe, pełniące funkcję aAPC. Obecnie dobrze opracowany jest już protokół hodowli ludzkich limfocytów T z wykorzystaniem magnetycznych mikrokulek opłaszczonych przeciwciałami anty-CD3 i anty-CD28 w obecności IL-2, będącej istotnym czynnikiem wzrostu limfocytów T [183,184,186]. Wykazano, że stymulacja limfocytów T za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28 prowadzi do kontrolowanej, stopniowej ekspansji tych komórek, co jest korzystniejsze w porównaniu do zastosowania naturalnych mitogenów roślinnych, takich jak konkanawalina A (ang. *concanavalin A*, ConA). Mitogeny te działają niespecyficznie i mogą indukować gwałtowną proliferację, a w konsekwencji szybką anergię limfocytów T [187].

1.6. Pies domowy jako model do badań immuno-onkologicznych

Pies domowy (*Canis lupus familiaris*) stanowi bardzo wartościowy model do badań w dziedzinie immunologii oraz onkologii. Układ immunologiczny psów wykazuje znaczne podobieństwa do ludzkiego, obejmujące m.in. charakterystykę głównych populacji komórek, w tym podobieństwa pomiędzy głównymi subpopulacjami komórek układu odpornościowego oraz ich markerami powierzchniowymi, a także mechanizmami odpowiedzi humoralnej i komórkowej [188,189].

W przeciwieństwie do tradycyjnych modeli laboratoryjnych wykorzystujących gryzonie, nowotwory u psów rozwijają się w sposób spontaniczny, a częstość ich występowania wzrasta wraz z wiekiem [190,191]. Jako zwierzęta towarzyszące człowiekowi, psy są narażone na podobne czynniki rakotwórcze, co zwiększa ich wartość jako modelu translacyjnego. Co istotne, przebieg chorób nowotworowych u psów, w tym mechanizmy tworzenia przerzutów i lokalizacja zmian wtórnych, bardzo często odzwierciedla obraz kliniczny obserwowany u ludzi [191,192]. Podobieństwa obejmują również odpowiedź immunologiczną oraz parametry prognostyczne, takie jak rozmiar i lokalizacja guza, a także obecność przerzutów. Zaletą jest również podobieństwo w odpowiedzi na wdrożone leczenie, co czyni psa atrakcyjnym modelem do badań nad skutecznością nowych terapii przeciwnowotworowych [188,191,193]. Szybsze tempo progresji nowotworów u psów w porównaniu do ludzi pozwala na znaczne skrócenie czasu trwania badań klinicznych oraz umożliwia wcześniejsze uzyskanie istotnych wyników. Ponadto duża liczebność i zróżnicowanie populacji w porównaniu z modelem mysim umożliwia prowadzenie losowych, kontrolowanych badań klinicznych, uwzględniających zarówno genetyczną, jak i środowiskową heterogeniczność zbliżoną do tej występującej w populacji ludzkiej [193]. Liczne podobieństwa na poziomie genetycznym i komórkowym, a także epidemiologicznym i klinicznym, między nowotworami u psów i ludzi dają uzasadnienie dla wykorzystania tego gatunku w badaniach z zakresu onkologii porównawczej. Stanowi to alternatywę dla modelu mysiego w zakresie zrozumienia skomplikowanych procesów zachodzących podczas progresji nowotworów u ludzi. Dotyczy to również opracowywania i testowania nowych metod terapii, badań nad farmakokinetyką, oceną działań niepożądanych leków, a także w zakresie nowoczesnych terapii komórkowych [189,193–195]. Jak dotąd model psa domowego znalazł zastosowanie w badaniach nad wieloma typami nowotworów, m.in.: białaczkami, chłoniakiem nieziarniczym, kostniakomięsakiem, czerniakiem, rakiem płuc, nowotworami głowy i szyi, rakiem gruczołu krokowego, rakiem pęcherza moczowego oraz nowotworami gruczołu sutkowego u suk, stanowiącymi model do badań guzów piersi u ludzi [189,191,196–199]. Aktualnie prowadzone są badania nad zastosowaniem u psów takich form immunoterapii jak: szczepionki przeciwnowotworowe, przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko punktom kontrolnym układu odpornościowego (PD-1, CTLA-4), terapie genowe modyfikujące mikrośrodowisko guza, a także terapie wykorzystujące zmodyfikowane limfocyty T – terapie CAR-T (ang. *chimeric antigen receptor T cell therapy*) [197,200–203].

Pomimo licznych zalet, badania z wykorzystaniem psów nadal napotykają pewne ograniczenia. Wśród nich wymienia się niedostateczną dostępność standaryzowanych odczynników specyficznych dla komórek izolowanych od psów. Przyczynia się to do trudności związanych z procedurami izolacji, hodowli czy też różnicowania komórek [196]. Dodatkowe wyzwanie stanowi wysoki koszt zaawansowanych terapii komórkowych [200]. Pomimo faktu, że wciąż wiele mechanizmów odpowiedzialnych za indukcję odpowiedzi przeciwnowotworowej u psów wymaga wyjaśnienia, badania prowadzone z wykorzystaniem tego modelu dostarczają wielu cennych informacji i mogą przyczynić się do rozwoju nie tylko medycyny weterynaryjnej, lecz także onkologii porównawczej [188]. W związku z tym konieczne są dalsze badania dążące do lepszego poznania molekularnych mechanizmów aktywacji limfocytów T u psów oraz opracowania wystandaryzowanych metod hodowli i ekspansji wybranych subpopulacji psich komórek układu immunologicznego w warunkach *in vitro*. Tematyka podjęta w niniejszej pracy doktorskiej wpisuje się bezpośrednio w powyższą problematykę badawczą.

2. Hipoteza i cele badawcze

Na podstawie uzyskanych wyników badań wstępnych oraz zgromadzonych danych literaturowych, w ramach przedstawionej pracy doktorskiej, postawiono następujące hipotezy badawcze:

- 1) Opracowanie optymalnych metod oraz warunków aktywacji i ekspansji psich limfocytów T w warunkach *in vitro* umożliwia uzyskanie komórek charakteryzujących się zdolnością do proliferacji, a także wysoką żywotnością i funkcjonalnością.
- 2) Zastosowanie mikrokulek magnetycznych pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko psim cząsteczkom CD3 i CD28 umożliwia skuteczną aktywację psich limfocytów T w warunkach *in vitro* poprzez jednoczesne zaangażowanie cząsteczki CD3 oraz cząsteczki kostymulującej CD28.
- 3) Aktywacja z zastosowaniem mikrokulek magnetycznych w połączeniu z hodowlą w odpowiedniej pożywce różnicującej pozwala na różnicowanie wyizolowanych limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17.
- 4) Modulacja szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina wpływa na proces różnicowania psich limfocytów Th17, kształtując ich fenotyp pamięci oraz aktywność metaboliczną.

W celu weryfikacji postawionych hipotez badawczych sformułowano następujące cele pracy doktorskiej:

- 1) Opracowanie i optymalizacja warunków aktywacji psich limfocytów T w warunkach *in vitro*, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu określonych typów mikrokulek magnetycznych.
- 2) Określenie wpływu proporcji mikrokulek magnetycznych do liczby komórek na skuteczność aktywacji psich limfocytów izolowanych z krwi obwodowej, ich zdolność do proliferacji, indukcję apoptozy oraz nabywanie fenotypu pamięci.
- 3) Ocena wpływu stymulacji psich limfocytów na syntezę cytokin efektorowych oraz aktywację wybranych szlaków sygnałowych.
- 4) Określenie wpływu temperatury na skuteczność aktywacji psich limfocytów izolowanych z krwi obwodowej.

- 5) Określenie optymalnej proporcji mikrokulek magnetycznych do liczby psich limfocytów T CD4⁺ w celu ich efektywnej aktywacji z zachowaniem wysokiej żywotności.
- 6) Opracowanie protokołu różnicowania psich limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17 w warunkach *in vitro*.
- 7) Zbadanie wpływu modulatorów szlaku Wnt/ β -katenina (indometacyna, TWS119, XAV939) na proces różnicowania psich limfocytów Th17.
- 8) Scharakteryzowanie fenotypowych i metabolicznych cech psich limfocytów Th17 różnicowanych z zastosowaniem modulatorów szlaku Wnt/ β -katenina.

2.1. Omówienie składu dysertacji

W skład dysertacji wchodzi dwie publikacje oryginalne: Szopa i wsp. 2021 (Publikacja 1) oraz Szopa i wsp. 2025 (Publikacja 2). Pierwsza publikacja skupia się na opracowaniu protokołu izolacji oraz aktywacji limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej psów domowych. Przedstawia ona szczegółowe wyniki doświadczeń mających na celu zoptymalizowanie stężenia czynnika stymulującego aktywację limfocytów T – mikrokulek magnetycznych pokrytych przeciwciałami przeciwko psim cząsteczkom CD3 i CD28, które zapewniają aktywację komórek z zaangażowaniem TCR oraz sygnał kostymulujący. Ustalenie optymalnego stosunku ilościowego mikrokulek magnetycznych było możliwe dzięki przeprowadzeniu doświadczeń weryfikujących wpływ zastosowanych mikrokulek na poziom cząsteczki CD25 (podjednostki α receptora interleukiny 2) – głównego markera aktywacji limfocytów T. Ponadto w dalszych etapach pracy określono wpływ różnych metod aktywacji oraz różnych proporcji mikrokulek magnetycznych na następujące parametry limfocytów:

- zdolność komórek do proliferacji,
 - synteza cytokin efektorowych (IL-2 oraz IFN- γ),
 - ekspresja wybranych genów, będących markerami wczesnych etapów aktywacji limfocytów T,
 - zdolność do nabywania fenotypu komórek pamięci (poziom CD62L i CD44),
 - aktywność metaboliczna limfocytów oraz indukcja apoptozy (badanie śmierci komórkowej indukowanej aktywacją (ang. *activation-induced cell death*, AICD)).
- W badaniach zaprezentowanych w Publikacji 1 sprawdzono także wpływ temperatury

na skuteczność procesu aktywacji limfocytów T izolowanych z krwi obwodowej psów domowych.

Doświadczenia, których wyniki przedstawiono w drugiej publikacji zostały przeprowadzone na limfocytach Th, wyizolowanych z krwi obwodowej psów domowych. Opracowano metodę aktywacji odpowiednią do hodowli czystej subpopulacji limfocytów Th z wykorzystaniem mikrokulek epoksydowanych (nazywanych EpoxyBeads), opłaszczonych przeciwciałami przeciwko psim cząsteczkom CD3 i CD28. W niniejszej publikacji opracowane zostały warunki niezbędne do skutecznego różnicowania limfocytów w kierunku fenotypu Th17. Zaktywowane komórki zostały poddane hodowli w obecności odpowiednich cytokin oraz przeciwciał neutralizujących. Dodatkowo określono wpływ czynników modyfikujących szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina, takich jak: indometacyna, XAV-939 (inhibitory ścieżki sygnałowej Wnt/ β -katenina) i TWS119 (aktywator ścieżki Wnt/ β -katenina) na różnicowanie psich limfocytów Th17. Skuteczność opracowanej metody zweryfikowano poprzez oznaczenie odsetka komórek syntetyzujących IL-17 (główną cytokinę wytwarzaną przez komórki Th17). Oznaczono również zdolność do wytwarzania IFN- γ , a także sprawdzono poziom czynnika transkrypcyjnego ROR γ t. Ponadto wyniki opisane w Publikacji 2 przedstawiają charakterystykę fenotypu komórek pamięci (poziom CD62L i CD44) oraz aktywność metaboliczną komórek różnicowanych w kierunku fenotypu Th17.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał do badań

Materiałem wykorzystywanym w badaniach były limfocyty krwi obwodowej (ang. *peripheral blood lymphocytes*, PBL) izolowane z krwi zdrowych psów domowych. Krew pobierana była od dawców Specjalistycznego Weterynaryjnego Banku Krwi w Warszawie. Zwierzęta będące dawcami krwi były w wieku od roku do siedmiu lat, cechowały się dobrym ogólnym stanem zdrowia, były poddawane regularnym szczepieniom przeciw chorobom zakaźnym oraz otrzymywały preparaty przeciwpasożytnicze.

3.2. Izolacja PBL oraz limfocytów Th

Procedurę pozyskania limfocytów krwi obwodowej rozpoczynano od izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), a następnie eliminowano monocyty. PBMC izolowano z krwi pełnej, która rozcieńczana była w sterylnym buforowanym fosforanami roztworze soli fizjologicznej (ang. *phosphate-buffered saline*, PBS) w stosunku 1:2. Wykorzystywano metodę wirowania w gradiencie stężeń z użyciem roztworu separującego Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Niemcy) lub Lymphoprep (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada) oraz probówek SepMate (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada). Po uzyskaniu warstwy zawierającej PBMC, komórki dwukrotnie przepłukiwano PBS zawierającym 20mM EDTA (autoMACS Rinsing Solution, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Niemcy) oraz 2% (v/v) płodowej surowicy bydlęcej (ang. *fetal bovine serum*, FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Wyizolowane komórki zawieszano w pożywce do hodowli limfocytów T składającej się z RPMI-1640 suplementowanej L-glutaminą i buforem HEPES z dodatkiem 10% (v/v) FBS, 1% (m/v) pirogronianu sodu, 1% (m/v) aminokwasów i 1% (m/v) penicyliny i streptomycyny (wszystkie odczynniki z Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Następnie komórki liczone przy pomocy automatycznego licznika komórek (Countess II Automated Cell Counter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), odpowiednio rozcieńczano pożywką do hodowli uzyskując stężenie 2×10^6 komórek/ml i wysiewano na butelki do hodowli adherentnych (Corning, Nowy Jork, USA). Po 24 godzinach inkubacji (38,5°C, 5% CO₂, wilgotność 95%) komórki nieprzytwierdzone do podłoża, pozostające w zawiesinie

stanowiły frakcję PBL. PBL zbierano, ponownie liczono i wykorzystywano do odpowiednich doświadczeń.

W przypadku badań opisanych w Publikacji 2, procedurę izolacji rozszerzono o etap izolacji limfocytów Th, prezentujących na swojej powierzchni cząsteczki CD4. W tym celu wykorzystywano zestaw odczynników pluriBead Cell Separation Kit (pluriSelect Life Science, Niemcy). Procedura izolacji limfocytów Th obejmowała inkubację otrzymanej wcześniej frakcji PBL z polistyrenowymi kulkami S-pluriBeads (pluriSelect Life Science, Niemcy), pokrytymi przeciwciałami wiążącymi receptory CD4. Następnie zawiesina komórek i kulek była przenoszona na odpowiedni filtr, a niezwiązane komórki odpłukiwano tak, aby na filtrze zostały wyłącznie kulki S-pluriBeads z przyłączonymi do nich limfocytami T CD4⁺. W kolejnym etapie, dzięki użyciu buforu odłączającego, możliwe było uzyskanie czystej populacji limfocytów Th. Komórki Th zawieszano w pożywce do hodowli, liczono i wykorzystywano w kolejnych doświadczeniach.

3.3. Aktywacja limfocytów T z zastosowaniem mikrokulek magnetycznych

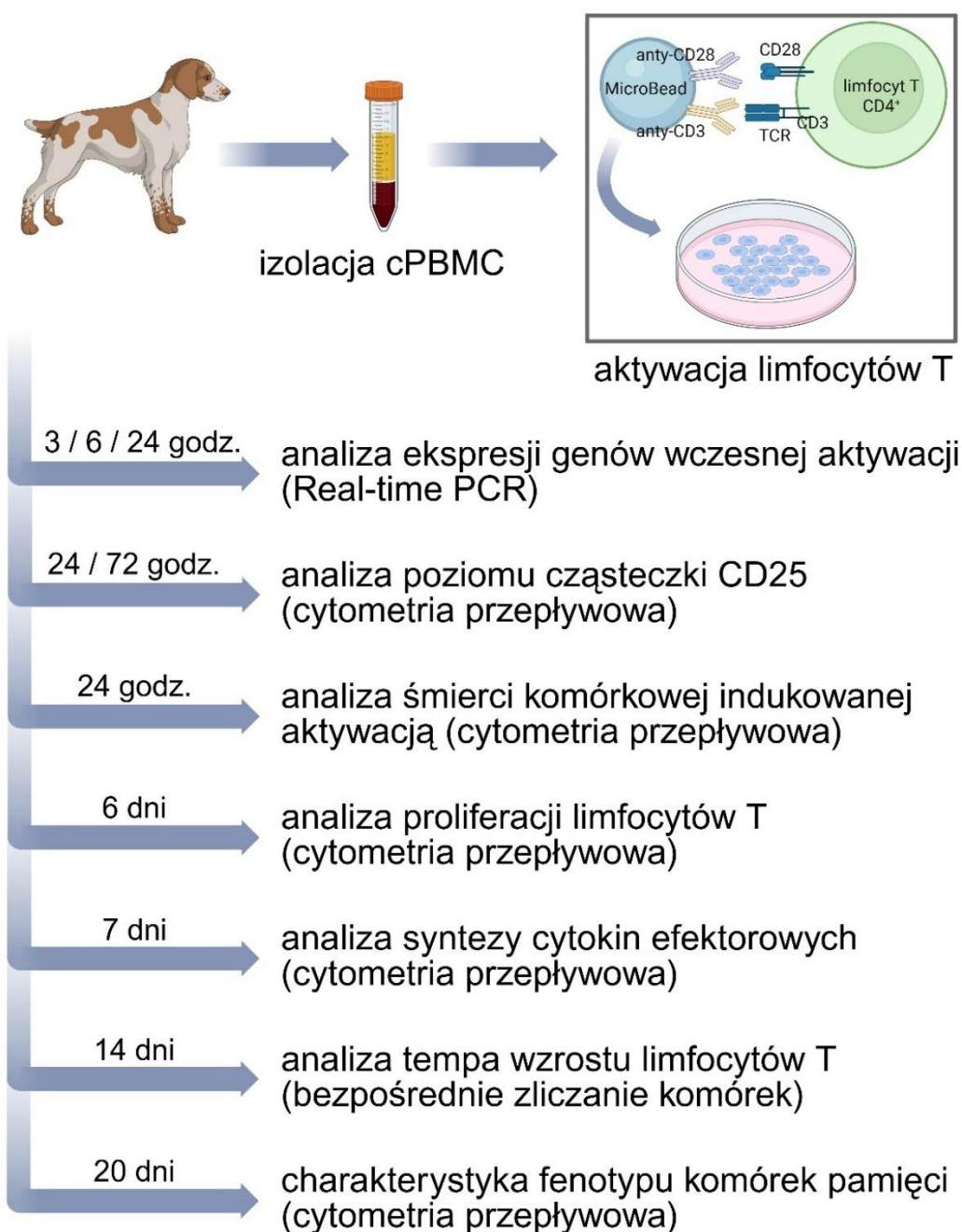
Otrzymaną populację PBL, w stężeniu 1×10^6 komórek/ml, zawieszano w pożywce do hodowli limfocytów, a następnie wysiewano na wielodołkowe płytki hodowlane (Corning, Nowy Jork, USA). Limfocyty aktywowano przy użyciu mikrokulek magnetycznych (MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Niemcy) lub konkanawaliny A (ConA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Zastosowane mikrokulki magnetyczne pokryte były przeciwciałami przeciwko psim cząsteczkom CD3 (klon CA17.2A12, Bio-Rad, Hercules, USA) oraz CD28 (klon 1C6, Functional Grade, eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Stężenie przeciwciał dobrano w taki sposób, aby ostatecznie wynosiło 0,5 µg każdego z przeciwciał na 1 ml pożywki zawierającej 1×10^6 PBL, co odpowiadało proporcji 1:1 (limfocyt T : mikrokulka magnetyczna). W celu modulacji siły sygnału aktywującego, limfocyty T inkubowano w różnych proporcjach do mikrokulek magnetycznych, testując następujące proporcje: 1:2, 1:1, 1:0,5, 1:0,25 lub 1:0,125. Kontrolę negatywną aktywacji stanowiły komórki niestymulowane, natomiast jako kontrolę pozytywną wykorzystano limfocyty stymulowane ConA (5 µg/ml) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), będącą naturalnym mitogenem roślinnym.

W przypadku doświadczeń dotyczących ekspansji limfocytów T, od trzeciego dnia hodowli pożywka była dodatkowo wzbogacana o rekombinowaną psią IL-2 (R&D

Systems, Minneapolis, USA) w stężeniu 10 ng/ml. W celu oceny wpływu temperatury, komórki inkubowano w warunkach: 33°C, 37°C, 38,5°C, 40°C lub 41°C, przy zachowaniu tego samego stężenia CO₂ (5%) oraz wilgotności (95%) w inkubatorze (Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japonia).

Komórki zbierano w określonych punktach czasowych, a następnie wykorzystywano do odpowiednich analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, metody Real-time PCR oraz immunoblotingu.



Rycina 4. Schemat metodyki wykorzystanej w badaniach przedstawionych w Publikacji 1.

3.4. Aktywacja limfocytów Th z zastosowaniem mikrokulek epoksydowanych

W badaniach przedstawionych w Publikacji 2 przeprowadzono optymalizację procedury aktywacji psich limfocytów Th. Opracowana w pierwszych etapach metoda aktywacji PBL z użyciem mikrokulek magnetycznych (MicroBeads), okazała się niewystarczająco skuteczna w przypadku hodowli czystej subpopulacji limfocytów T CD4⁺. Sprawdzono więc skuteczność zastosowania różnych proporcji mikrokulek epoksydowanych (Dynabeads™ M-450 Epoxy, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), określanych dalej w pracy jako „EpoxyBeads”. Mikrokulki te, podobnie jak w przypadku MicroBeads, pokrywano przeciwciałami skierowanymi przeciwko psim cząsteczkom CD3 (klon CA17.2A12, Bio-Rad, Hercules, USA) oraz CD28 (klon 1C6, Functional Grade, eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) w stężeniach zalecanych przez producenta. Do oceny skuteczności aktywacji limfocyty T CD4⁺ wysiewano w stężeniu 2×10^6 komórek/ml na płytki 48-dołkowe (Corning, Nowy Jork, USA) w pożywce przeznaczonej do hodowli limfocytów T (skład pożywki opisano w podrozdziale 3.2.), a następnie stymulowano EpoxyBeads. W celu ustalenia najlepszych warunków i uzyskania maksymalnego poziomu aktywacji, zastosowano różne proporcje EpoxyBeads do limfocytów Th. Wynosiły one odpowiednio: 2:1, 1:1, 0,5:1 lub 0,25:1. Pozytywną kontrolę aktywacji stanowiły limfocyty T CD4⁺ stymulowane ConA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) w stężeniu 5 µg/ml.

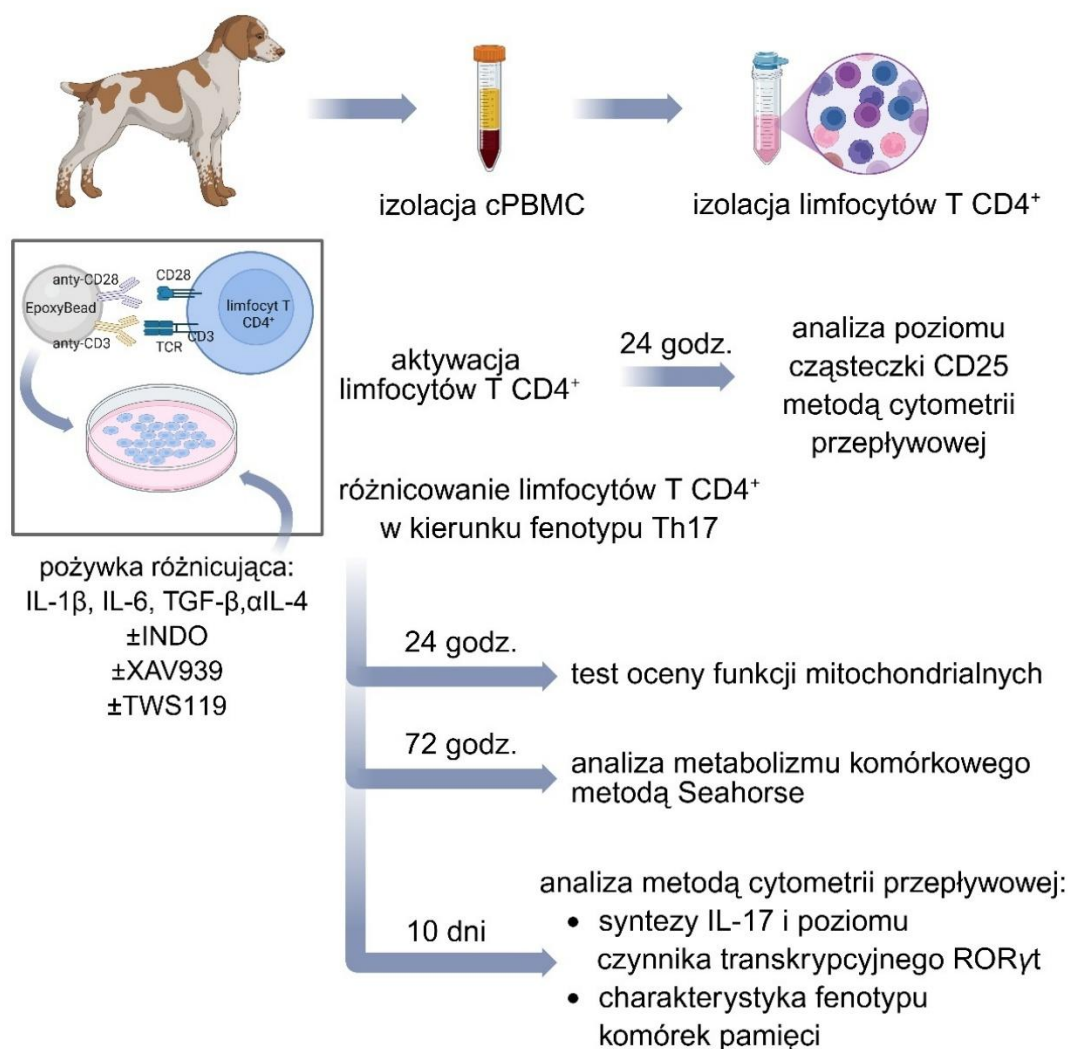
Po 24-godzinnej stymulacji oceniano poziom markera aktywacji – cząsteczki CD25 – na powierzchni limfocytów Th z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej.

3.5. Różnicowanie limfocytów Th w kierunku fenotypu Th17

W celu ukierunkowania różnicowania limfocytów T CD4⁺ w stronę fenotypu Th17, komórki aktywowano za pomocą opracowanej metody (opisanej w podrozdziale 3.4) oraz zastosowano pożywkę różnicującą. Składała się ona z pożywki dla limfocytów T wzbogaconej o rekombinowaną psią IL-1β (10 ng/ml), rekombinowaną psią IL-6 (5 ng/ml), rekombinowany ludzki TGF-β (2 ng/ml) oraz przeciwciało skierowane przeciwko psiej IL-4 (2 ng/ml) (wszystkie od R&D Systems, Minneapolis, USA). W przypadku doświadczeń, które wymagały długoterminowej hodowli limfocytów Th, trzeciego dnia mikrokulki EpoxyBeads usuwano z pożywki, którą dodatkowo suplementowano rekombinowaną psią IL-2 (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis,

USA) oraz rekombinowaną ludzką IL-23 (30 ng/ml) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

W badaniach mających na celu ocenę wpływu modulacji szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina, pożywka różnicująca dodatkowo wzbogacana była o wybrane czynniki modyfikujące ten szlak: indometacynę (60 μ M), XAV939 (1 μ M) lub TWS119 (2 μ M) (wszystkie od Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Niemcy). Limfocyty Th umieszczano w inkubatorze, zapewniając optymalne warunki hodowli: temperaturę 38,5°C, 5% CO₂ oraz 95% wilgotność (Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japonia). W określonych punktach czasowych komórki poddawano analizie cytometrycznej oraz ocenie metabolizmu komórkowego z wykorzystaniem systemu Seahorse XFp Cell Mito Stress.



Rycina 5. Schemat metodyki wykorzystanej w badaniach przedstawionych w Publikacji 2.

3.6. Immunofenotypowanie limfocytów oraz analiza wybranych parametrów funkcjonalnych za pomocą cytometrii przepływowej

Zarówno populację PBL (wyniki prezentowane w Publikacji 1), jak również limfocytów Th (wyniki prezentowane w Publikacji 2) analizowano z wykorzystaniem metody cytometrii przepływowej. Analiza ta obejmowała barwienie zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe z wykorzystaniem przeciwciał skoniugowanych z fluorochromami (Tabela 1), a także oznaczenie odsetka komórek apoptotycznych, oznaczenie aktywności metabolicznej i poziomu proliferacji oraz test oceny funkcji mitochondrialnych.

Barwienie zewnątrzkomórkowe wykorzystywane było do oznaczania obecności charakterystycznych cząsteczek powierzchniowych. Polegało ono na przepłukaniu komórek buforem FACS (PBS z dodatkiem 2% (v/v) FBS [Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA]), a następnie inkubowaniu z odpowiednimi przeciwciałami przez 20 min. w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Dodatkowo w procedurze wykorzystywano zestaw odczynników LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), który umożliwiał wykluczenie z analizy komórek martwych. Po dwukrotnym odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał komórki zawieszano ponownie w buforze FACS i poddawano analizie.

W przypadku barwienia wewnątrzkomórkowego, przygotowanie komórek do analizy cytometrycznej polegało na 4- lub 6-godzinnej restymulacji z użyciem 12-mirystynianu, 13-octanu forbolu (ang. *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*, PMA) w stężeniu 15 ng/ml oraz jonomycyny w stężeniu 500 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, USA). Proces restymulacji odbywał się w obecności Brefeldyny A (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), dodawanej 2 godziny po rozpoczęciu inkubacji. Powyższa procedura umożliwiała indukcję syntezy cytokin przy jednoczesnym zahamowaniu ich wydzielania. Następnie przeprowadzano barwienie zewnątrzkomórkowe, zgodnie z protokołem opisanym powyżej. W kolejnych etapach barwienia wykorzystywano zestaw odpowiednich odczynników. W badaniach zaprezentowanych w Publikacji 1 wykorzystywano zestaw Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Limfocyty inkubowano w buforze utrwalającym przez 20 min. w temperaturze pokojowej, a następnie przemywano i zawieszano w buforze do permeabilizacji

na kolejne 20 min. W kolejnych etapach komórki inkubowano przez 30 min. z przeciwciałami pierwszorzędowymi oraz 30 min. z przeciwciałami drugorzędowymi.

Barwienie wewnątrzkomórkowe, wykorzystywane w doświadczeniach opisanych w Publikacji 2, miało na celu nie tylko wykrycie syntetyzowanych cytokin, ale także czynników transkrypcyjnych. W tym celu używano zestawu Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Komórki inkubowano przez 45 min. w buforze utrwalająco-permeabilizującym w temperaturze 4°C, po czym zawieszano je w buforze permeabilizującym z dodatkiem odpowiednio rozcieńczonych przeciwciał sprzężonych z fluorochromami. Następnie inkubowano je przez 20 min. w temperaturze pokojowej w ciemności. W obydwu przypadkach po zakończeniu barwienia komórki przemywano dwukrotnie buforem FACS, a następnie analizowano przy użyciu cytometru przepływowego.

W celu analizy AICD oraz oznaczenia aktywności metabolicznej limfocytów wykorzystano zestaw z C12-resazuryną, aneksyną V oraz barwnikiem SYTOX™ Green (Metabolic Activity Dead Cell Apoptosis Kit with C12 Resazurin, Annexin V, and SYTOX™ Green [Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA]). Do oceny zdolności proliferacyjnych limfocytów zastosowano zestaw CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Poszczególne etapy barwienia komórek przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

Test oceny funkcji mitochondrialnych przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch barwników fluorescencyjnych: estru metylowego tetrametylorodaminy (ang. *tetramethylrhodamine methyl ester*, TMRM) oraz odczynnika MitoTracker (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), umożliwiających odpowiednio ocenę potencjału błonowego mitochondriów oraz masy mitochondrialnej. Procedura barwienia polegała na zawieszeniu limfocytów T CD4⁺ w pożywce hodowlanej o temperaturze 37°C zawierającej TMRM (250 nM) oraz barwnik MitoTracker (125 nM). Inkubację prowadzono przez 30 min. w temperaturze 37°C bez dostępu światła. Następnie komórki odwirowywano (4 min., 300 × g), zawieszano w buforze FACS o temperaturze 37°C i poddawano analizie cytometrycznej.

Wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego BD FACS Aria II (Becton Dickinson, Heidelberg, Niemcy). Uzyskane dane poddano analizie w oprogramowaniu FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, USA). Limfocyty wyodrębniano na podstawie parametrów wielkości (ang. *forward scatter*, FSC) i ziarnistości

(ang. *side scatter*, SSC) komórek. Z analizy wykluczano zgrupowania komórek oraz komórki martwe. Szczegółowy sposób bramkowania dla poszczególnych doświadczeń został opisany oraz przedstawiony na Rycinie 2 w Publikacji 1 oraz Rycinie 1 w Publikacji 2.

Tabela 1. Przeciwciała wykorzystywane w analizie cytometrycznej

Nazwa przeciwciała	Klon	Producent / numer katalogowy
szczurze przeciwciało anty - CD5 sprzężone z fluorochromem eFluor710	YKIX322.3	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA/ nr kat.: 17-5040-42
szczurze przeciwciało anty - CD4 sprzężone z fluorochromem APC	YKIX302.9	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA/ nr kat.: 17-5040-42
szczurze przeciwciało anty - CD4 sprzężone z fluorochromem PE-Cyanine7	YKIX302.9	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA / nr kat.: 25-5040-42
szczurze przeciwciało anty - CD8a sprzężone z fluorochromem v450	YCATE55.9	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA/ nr kat.: 48-5080-42
mysie przeciwciało anty - CD25 sprzężone z fluorochromem FITC	P4A10	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA/ nr kat.: 11-0250-42
szczurze przeciwciało anty - CD44 sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor 488	YKIX337.8.7	Bio-Rad, Hercules, USA/ nr kat.: MCA1041GA
mysie przeciwciało anty - CD62L sprzężone z fluorochromem PE	FMC46	Bio-Rad, Hercules, USA/ nr kat.: MCA1076G
mysie przeciwciało anty - IL-17A sprzężone z fluorochromem PerCP- Cyanine5.5	eBio64DEC17	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA/ nr kat.: 45-7179-41
szczurze przeciwciało anty - RORγt sprzężone z fluorochromem APC	AFKJS-9	eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA/ nr kat.: 17-6988-82
mysie przeciwciało anty - IFN-γ sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor 488	CC302	Bio-Rad, Hercules, USA/ nr kat.: MCA1783
pierwszorzędowe królicze przeciwciało anty - IL-2	-	Bio-Rad, Hercules, USA/ nr kat.: AHP2981
drugorzędowe owcze przeciwciało skierowane przeciwko króliczym IgG sprzężone z fluorochromem PE	-	Bio-Rad, Hercules, USA/ nr kat.: STAR35A

3.7. Analiza ekspresji genów będących markerami wczesnych etapów aktywacji metodą Real-time PCR

3.7.1 Izolacja mRNA oraz reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowite RNA izolowano z limfocytów stymulowanych czynnikiem aktywującym przez 3, 6 oraz 24 godziny. Procedurę izolacji RNA przeprowadzono z wykorzystywaniem zestawu odczynników RNAqueous™ - Micro Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) w oparciu o protokół producenta. Stężenie wyizolowanego RNA określano za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, USA). W celu przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystywano 1 µg całkowitego RNA oraz zestaw odczynników High-capacity FG RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zgodnie z instrukcją producenta.

3.7.2 Reakcja Real-time PCR

Reakcje ilościowego PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono przy użyciu odczynnika SYBR Green Select Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zgodnie z instrukcją producenta. Oceniono ekspresję genów powiązanych z wczesnymi etapami aktywacji: *CD69*, *CD25*, *PTGS2*, *FOS*, *EGR2*, *RGS1* i *GADD45B*. Do normalizacji poziomu ekspresji genów docelowych wykorzystano geny *RPS19* i *HPRT*. Do oceny względnego poziomu ekspresji badanych genów zastosowano pośrednią metodę analizy, umożliwiającą porównanie poziomu ekspresji badanych genów względem genów referencyjnych. Przeprowadzone obliczenia opisuje następujące równanie:

$$\text{względny poziom ekspresji} = 2^{-\Delta Ct},$$

gdzie ΔCt oznacza różnicę wartości Ct pomiędzy genem badanym a genem referencyjnym.

Szczegółowe warunki reakcji Real-time PCR oraz tabela przedstawiająca sekwencje zastosowanych starterów zostały opisane w rozdziale „Materiały i metody” w Publikacji 1.

3.8. Wykrywanie i identyfikacja białek związanych ze ścieżkami sygnałowymi MAPK oraz PI3K/Akt metodą Western blot

Izolację całkowitego białka z komórek przeprowadzono przy użyciu buforu RIPA (ang. *radioimmunoprecipitation assay*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; nr katalogowy: 89900) z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; nr katalogowy: 78446) zgodnie z protokołem producenta. Podczas wszystkich etapów doświadczenia, rozpoczynając od zebrania osadów komórkowych i izolacji białka, aż do nakładania białka na żel poliakrylamidowy gradientowy, próbki znajdowały się w łaźni lodowej. W celu nałożenia na żel poliakrylamidowy takiej samej ilości białka z każdej próbki wykonano pomiar stężenia białka przy użyciu komercyjnie dostępnego testu kwasu bicynchoninowego (ang. *bicinchoninic acid assay*, BCA assay) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; nr katalogowy: J63283.QA). Elektroforezę prowadzono na żelach poliakrylamidowych gradientowych (Bio-Rad, Hercules, USA) przy użyciu aparatu do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra cell firmy Bio-Rad (Hercules, USA). Na żel nanoszono 20 µg białka oraz marker masy cząsteczkowej (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; nr katalogowy: 26619). Następnie przeprowadzono elektro-transfer na membranę nitrocelulozową (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; nr katalogowy: 88013) pod napięciem 75V przez 90 minut. Efektywność transferu oceniano poprzez barwienie membrany czerwienią Ponceau (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; nr katalogowy: J63139.AP). W celu zablokowania nieswoistego wiązania przeciwciał, membrany inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w buforze blokującym składającym się z buforu TBST (20 mM Tris-HCL; 500 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) z dodatkiem 5% (m/v) albuminy surowicy bydlęcej [ang. *bovine serum albumin*, BSA] [Merck/Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy]). W kolejnym etapie przeprowadzono inkubację z przeciwciałami pierwszorzędowymi rozcieńczonymi w buforze blokującym (Tabela 2). Inkubację wykonywano przez noc w temperaturze 4°C. Po tym czasie membrany trzykrotnie płukano w buforze TBST i inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi (Tabela 2) rozcieńczonymi w buforze TBS (20 mM Tris-HCL; 500 mM NaCl). Inkubację wykonywano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie membrany trzykrotnie płukano w buforze TBST i dokonywano wizualizacji uzyskanych prążków w systemie ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, USA).

Kontrolę ilości nałożonego na żel białka przeprowadzono poprzez immunodetekcję białek referencyjnych β -aktyny lub Histon H3 (Tabela 2).

Tabela 2. Wykaz przeciwciał wykorzystywanych do immunoblotingu

Nazwa przeciwciała	Klon	Producent / numer katalogowy
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) w formie ufosforylowanej	D13.14.4E	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 4370
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	137F5	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 4695
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko kinazie p70 S6 w formie ufosforylowanej	108D2	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 9234
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko kinazie p70 S6	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 9202
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko RSK1/RSK2/RSK3	D7A2H	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 14813
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko Akt w formie ufosforylowanej	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 9271
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko Akt	-	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 9272
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko PI3 kinazie p110 δ	D1Q7R	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 34050
pierwszorzędowe królicze przeciwciała przeciwko histonowi H3	3H1	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 9717
pierwszorzędowe mysie przeciwciała przeciwko β -aktynie	8H10D10	Cell Signaling Technology, Danvers, USA/ nr kat.: 3700
drugorzędowe ośle przeciwciała anty-królicze IgG sprzężone z barwnikiem IRDye® 800CW	-	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA/ nr kat.: 926-32213
drugorzędowe kozie przeciwciała anty-mysie IgG sprzężone z barwnikiem IRDye® 680RD	-	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA/ nr kat.: 926-68070

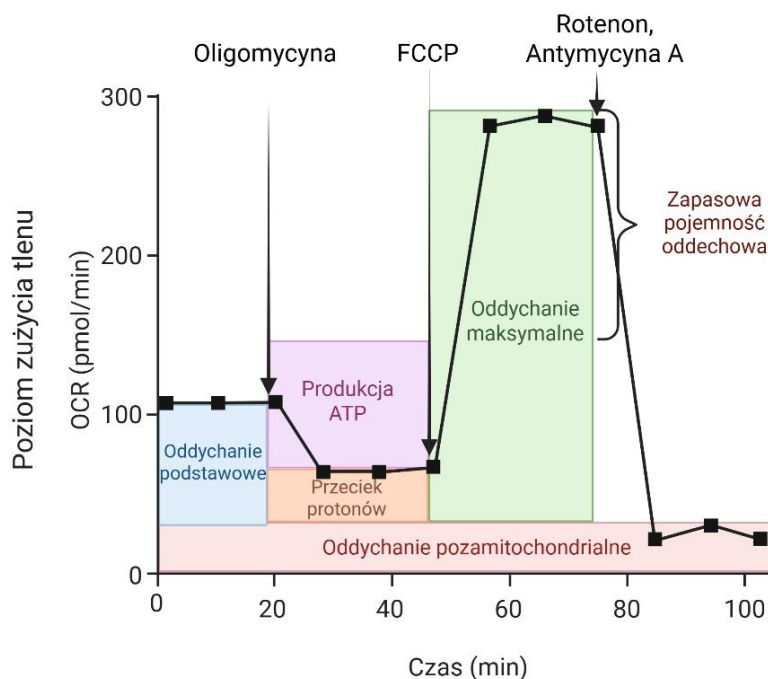
3.9. Ocena metabolizmu komórkowego z wykorzystaniem systemu Seahorse

W celu określenia aktywności metabolicznej limfocytów T CD4⁺ różnicowanych w kierunku fenotypu Th17 wykorzystano system Seahorse XF HS Mini (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), umożliwiający pomiar szybkości zużycia tlenu (ang. *oxygen consumption rate*, OCR) w czasie rzeczywistym.

Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem testu Seahorse XF Cell Mito Stress Test (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), który umożliwia kompleksową ocenę funkcji mitochondriów w komórkach. Ocena parametru OCR wykorzystywana jest jako wskaźnik aktywności łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej. Test opiera się na sekwencyjnym dodawaniu trzech związków: oligomycyny, będącej inhibitorem syntazy ATP, FCCP (ang. *carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*), który rozprzęga potencjał błon mitochondrialnych oraz mieszaniny rotenonu i antymycyny A, które są inhibitorami odpowiednio kompleksu I i III w łańcuchu oddechowym. Analiza zmian OCR po podaniu tych związków pozwala określić kluczowe parametry bioenergetyczne w komórkach.

Przygotowanie komórek do doświadczenia obejmowało odpowiednią prestymulację limfocytów T CD4⁺ (Rycina 5). Następnie komórki zawieszano w pożywce Seahorse XF RPMI suplementowanej 1 mM pirogronianem, 2 mM L-glutaminą i 10 mM glukozą (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) i wysiewano na 8-dółkowe płytki Seahorse XFp (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) w taki sposób, aby liczba komórek w każdym dołku wynosiła $0,5 \times 10^6$. Przed analizą płytki z komórkami inkubowano przez 1 godzinę w 37°C.

Przeprowadzenie analizy obejmowało 3 pomiary bez żadnej stymulacji, co pozwoliło na wyznaczenie oddychania podstawowego. Następnie przez odpowiednie porty w przygotowanej wcześniej nakładce na płytce Seahorse XFp dozowano kolejno odpowiednie odczynniki: oligomycynę (końcowe stężenie 1,5 μM), FCCP (końcowe stężenie 1,5 μM) oraz mieszaninę rotenonu i antymycyny A (końcowe stężenie 0,5 μM). Każdorazowo po dodaniu odpowiednich związków następowała 10-minutowa inkubacja oraz seria 3 pomiarów OCR. Schemat przeprowadzanego doświadczenia został przedstawiony na Rycinie 6. Uzyskane dane zanalizowano za pomocą oprogramowania Agilent Seahorse Analytics dostępnego online (<https://seahorseanalytics.agilent.com>; dostęp 12 listopada 2024) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).



Rycina 6. Schemat doświadczenia oceniającego metabolizm z wykorzystaniem testu Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Opracowanie własne.

3.10. Analiza statystyczna oraz opracowanie graficzne wyników

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism™ 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Porównania pomiędzy dwiema grupami wykonano za pomocą dwustronnego testu t-Studenta z korektą Welcha dla rozkładu parametrycznego lub testu Manna-Whitneya w przypadku rozkładu nieparametrycznego. W analizach obejmujących wiele grup zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA) z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya lub dwuczynnikową analizę wariancji (two-way RM ANOVA). Szczegółowy opis zastosowanych testów statystycznych znajduje się w legendach rycin w załączonych publikacjach. Za istotne statystycznie uznano wartości $p < 0,05$ (*), natomiast $p < 0,01$ (**) oraz $p < 0,001$ (***) za wysoce istotne statystycznie.

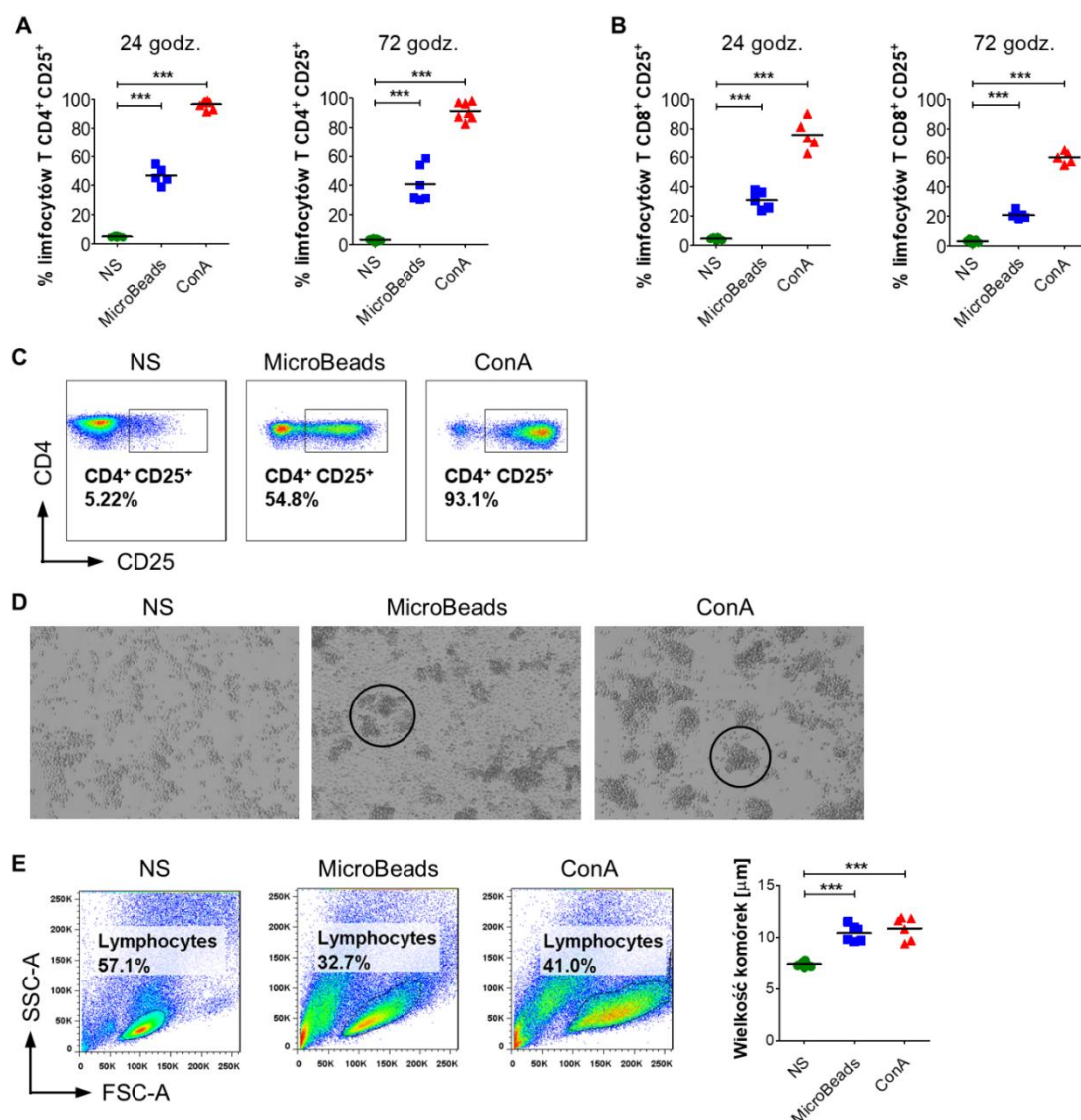
Ryciny 1 – 6 zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przygotowane z wykorzystaniem oprogramowania internetowego BioRender.

4. Wyniki

4.1. Ocena skuteczności aktywacji psich limfocytów T z wykorzystaniem mikrokulek magnetycznych MicroBeads

Stopień aktywacji psich PBL został określony na podstawie poziomu cząsteczki powierzchniowej CD25, będącej głównym markerem aktywacji. Analizie poddano limfocyty po 24 oraz 72 godzinach stymulacji z użyciem mikrokulek magnetycznych MicroBeads opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom CD3 oraz CD28. Kontrolę negatywną stanowiły komórki niestymulowane (NS), natomiast kontrolą pozytywną były PBL traktowane ConA. Analiza cytometryczna wykazała, że zarówno stymulacja MicroBeads, jak i ConA powodowała istotny statystycznie wzrost poziomu białka CD25 na powierzchni limfocytów T ($p < 0,001$) w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (Publikacja 1, Rycina 2C-E). ConA aktywowała zdecydowaną większość limfocytów T CD4⁺ oraz T CD8⁺. Po 24-godzinnej stymulacji mikrokulki magnetyczne MicroBeads indukowały aktywację blisko połowy limfocytów T CD4⁺ oraz około 30% limfocytów T CD8⁺ (Rycina 7 A i B oraz w Publikacji 1, Rycina 2D). Po 72 godzinach od stymulacji poziom CD25 na limfocytach T CD8⁺ nieznacznie malał, natomiast utrzymywał się na podwyższonym poziomie w limfocytach T CD4⁺ (Rycina 7 A i B oraz w Publikacji 1, Rycina 2D).

Oceniono również stopień aktywacji na podstawie cech morfologicznych komórek. Aktywacja zarówno z użyciem ConA, jak i MicroBeads powodowała powstawanie licznych charakterystycznych agregatów komórkowych, będących typową cechą aktywacji limfocytów. Komórki niestymulowane tworzyły pojedynczą warstwę (Rycina 7D oraz w Publikacji 1, Rycina 2F). Ponadto PBL stymulowane za pomocą MicroBeads zwiększały swoją objętość, co potwierdził zarówno pomiar z użyciem automatycznego licznika komórek, jak i analiza cytometryczna w oparciu o parametr FSC (Rycina 7E oraz w Publikacji 1, Rycina dodatkowa 1).

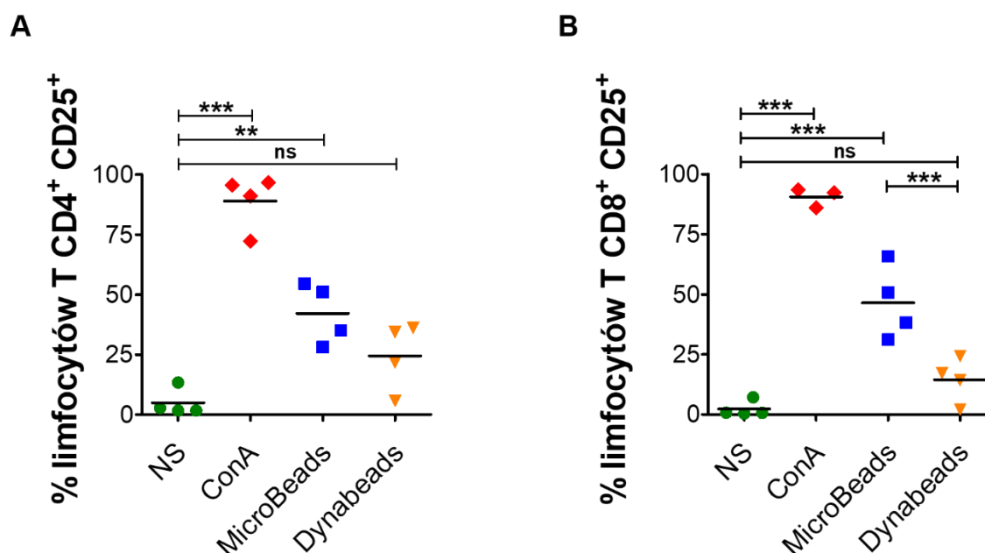


Rycina 7. Analiza aktywacji psich limfocytów T

(A, B) Wykresy punktowe przedstawiające procent aktywowanych limfocytów T CD4⁺CD25⁺ oraz CD8⁺CD25⁺ po 24 oraz 72 godzinach stymulacji z użyciem mikrokulek magnetycznych MicroBeads lub konkanawaliny A (ConA). Porównania pomiędzy badanymi grupami a komórkami kontrolnymi (NS) wykonano z użyciem dwustronnego testu t-Studenta ($p < 0,001$ (***)). (C) Reprezentatywne cytogramy obrazujące procent limfocytów T CD4⁺CD25⁺. (D) Reprezentatywne zdjęcia przedstawiające limfocyty niestymulowane (NS) oraz stymulowane za pomocą MicroBeads lub ConA. Na zdjęciach zaznaczono okręgami agregaty komórek po stymulacji (powiększenie $\times 100$). (E) Reprezentatywne cytogramy oraz wykres punktowy przedstawiające zmiany wielkości komórek w wyniku aktywacji z zastosowaniem MicroBeads i ConA.

Badając poziom cząsteczki CD25 na limfocytach T psów, porównano także efektywność stymulacji mikrokulkami magnetycznymi (MicroBeads) z innym typem mikrokulek magnetycznych - Dynabeads™ M-450 EpoxyBeads (określane dalej w niniejszej pracy jako EpoxyBeads). EpoxyBeads są znacznie większe ($4,5 \mu\text{m}$

średnicy), zawierają powierzchniowe grupy epoksydowe i wiążą kowalencyjnie grupy aminowe i sulfhydrylowe białek oraz peptydów, co umożliwia ich sprzężanie z przeciwciałami. Wykazano, że w przypadku hodowli PBL, zastosowanie MicroBeads znacznie silniej indukuje prezentację CD25 na psich limfocytach T niż zastosowanie EpoxyBeads (Rycina 8 A i B oraz w Publikacji 1, Rycina dodatkowa 2).



Rycina 8. Analiza aktywacji psich limfocytów T z zastosowaniem różnych rodzajów mikrokulek magnetycznych

(A, B) Wykresy punktowe przedstawiające odsetek aktywowanych limfocytów T CD4⁺ oraz T CD8⁺ wśród komórek niestymulowanych (NS) oraz aktywowanych z użyciem ConA, mikrokulek magnetycznych MicroBeads oraz Dynabeads. Dane przedstawiono w postaci punktów odpowiadających poszczególnym dawcom, wraz z zaznaczoną średnią (n = 4). Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) z testem post hoc wielokrotnych porównań Tukeya (p < 0,01 (**), p < 0,001 (***)).

4.2. Analiza zmian ekspresji genów związanych z wczesną aktywacją

W celu weryfikacji skutecznej aktywacji psich PBL przez mikrokulki magnetyczne MicroBeads, przeprowadzono również analizę ekspresji genów związanych z wczesną aktywacją komórek, kontrolą proliferacji i cyklu komórkowego. Do tej grupy należały geny kodujące: syntazę prostaglandyny 2 (ang. *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*, *PTGS2*), homolog onkogenu v-Fos mysiego wirusa kostniakomięsaka FBJ (ang. *V-FOS FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*, *FOS*), białko indukowane zatrzymaniem wzrostu i uszkodzeniem DNA (ang. *growth arrest and DNA damage-inducible gene*, *GADD45B*), wczesny gen odpowiedzi na wzrost 2 (ang. *early growth response 2*, *EGR2*) oraz regulator sygnalizacji białek G (ang. *regulator of G*

protein signaling, RGS1) (Publikacja 1, Rycina 1A-E). Dodatkowo oceniono ekspresję genów *CD25* i *CD69*. Częsteczka *CD69* jest transbłonowym receptorem typu II z rodziny lektyn C i stanowi klasyczny wczesny marker aktywacji limfocytów u ludzi i myszy. Dynamikę zmian ekspresji genów określono poprzez pobranie komórek po 3, 6 oraz 24 godzinach od momentu stymulacji. Prawie wszystkie analizowane geny wykazywały istotny statystycznie wzrost ekspresji już po 3 godzinach stymulacji zarówno MicroBeads, jak i ConA (Publikacja 1, Rycina 1A-E). Jedyne wyjątkiem stanowił gen *FOS*, którego ekspresja po 3 godzinach od aktywacji z użyciem MicroBeads nie różniła się istotnie statystycznie od poziomu obserwowanego w komórkach niestymulowanych. Po 6 godzinach nadal utrzymywał się podwyższony poziom ekspresji genów *PTGS2*, *GADD45B*, *EGR2* i *RGS1*, natomiast po 24 godzinach wartości te powracały do poziomu wyjściowego. Wyjątkowo ekspresja genu *FOS* po 24 godzinach była istotnie niższa w porównaniu z komórkami niestymulowanymi. Ponadto wykazano, że limfocyty stymulowane MicroBeads, podobnie jak te traktowane ConA, wykazywały istotnie zwiększoną ekspresję *CD69* i *CD25* po 3 i 6 godzinach od aktywacji w porównaniu z komórkami kontrolnymi (Publikacja 1, Rycina 1F, G). W przypadku genu *CD25* podwyższony poziom ekspresji utrzymywał się nawet po 24 godzinach od stymulacji (Publikacja 1, Rycina 1G).

4.3. Ocena wpływu stężenia MicroBeads na poziom aktywacji oraz zdolność limfocytów T do proliferacji

Intensywność sygnału aktywującego wpływa na dynamikę odpowiedzi limfocytów T. Dlatego też przeprowadzono analizę, w której oceniono, jak różne ilości mikrokulek magnetycznych MicroBeads w stosunku do liczby komórek wpływają na poziom ich aktywacji i proliferacji. W tym celu zastosowano różne proporcje limfocytów T do MicroBeads (1:2, 1:1, 1:0,5, 1:0,25 oraz 1:0,125) (Publikacja 1, Rycina 3A). Efektywność aktywacji oceniono na podstawie poziomu cząsteczki *CD25* na powierzchni limfocytów T. Co ciekawe, zaobserwowano, że zastosowanie stosunkowo niskiego stężenia mikrokulek magnetycznych MicroBeads podawanych do hodowli (proporcje 1:0,5 i 1:0,25) najskuteczniej indukowało zwiększenie poziomu *CD25* w limfocytach T $CD4^+$ (Publikacja 1, Rycina 3B, D). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku limfocytów T $CD8^+$, gdzie niższe stężenia MicroBeads (proporcje 1:0,5, 1:0,25 i 1:0,125) były wystarczające do skutecznej aktywacji komórek, na poziomie około 40% (Publikacja 1, Rycina 3C, E).

Proliferację limfocytów T po aktywacji z zastosowaniem różnych proporcji mikrokulek magnetycznych MicroBeads oceniono za pomocą barwienia znacznikiem CellTrace Far Red. Analiza cytometryczna wykazała, że najwyższy poziom proliferacji limfocytów T uzyskano w przypadku zastosowania proporcji limfocytów T do MicroBeads 1:0,5 oraz 1:0,25 (Publikacja 1, Rycina 4A, B). W 6 dniu hodowli komórkowej odsetek proliferujących komórek T wynosił odpowiednio $47,6 \pm 6,1\%$ i $57,9 \pm 5,8\%$. Co istotne, zastosowanie wyższych stężeń mikrokulek magnetycznych MicroBeads (proporcje 1:2, 1:1) powodowało istotnie słabszą aktywację oraz proliferację psich limfocytów T (Publikacja 1, Rycina 3 i 4).

Dodatkowo oceniono ekspansję komórek, wykonując liczenie co drugi dzień przez 14 dni hodowli komórkowej (Publikacja 1, Rycina 4C, D). Analiza dynamiki ekspansji wykazała, że limfocyty T po stymulacji MicroBeads w proporcjach 1:0,5 oraz 1:0,25 namnażały się najintensywniej. Co więcej, uzyskane w tych warunkach doświadczalnych wyniki były porównywalne z kontrolą pozytywną, którą stanowiły komórki stymulowane ConA. Po dwóch tygodniach hodowli komórkowej istotny wzrost liczby komórek ($p < 0,001$) odnotowano wyłącznie w przypadku proporcji 1:0,5 i 1:0,25 oraz po stymulacji ConA (Publikacja 1, Rycina 4D).

4.4. Ocena wpływu temperatury na skuteczność aktywacji limfocytów T

Biorąc pod uwagę, że fizjologiczna temperatura ciała psów mieści się w zakresie $38,3 - 39,2^{\circ}\text{C}$ (w zależności od rasy), podjęto próbę określenia optymalnych warunków hodowli psich limfocytów T w zakresie temperatur $33 - 41^{\circ}\text{C}$. Status aktywacji komórek oceniono na podstawie poziomu cząsteczki CD25 po 24 i 72 godzinach stymulacji z wykorzystaniem mikrokulek magnetycznych MicroBeads oraz mitogenu ConA. Niska temperatura (33°C) zaburzała aktywację limfocytów T CD4^{+} po 24 i 72 godzinach stymulacji zarówno ConA, jak i MicroBeads (Publikacja 1, Rycina 5). Również inkubacja limfocytów T w wyższych temperaturach (40°C i 41°C) przez 72 godziny prowadziła do obniżenia poziomu ich aktywacji (Publikacja 1, Rycina 5B). Przeprowadzone badania wykazały, że optymalny zakres temperatur dla hodowli psich limfocytów T mieści się w granicach $\sim 37 - 38,5^{\circ}\text{C}$. W takim zakresie temperatur obserwowano wysoki poziom cząsteczki CD25. Dodatkowo wykazano, że zastosowanie niższych stężeń MicroBeads (proporcja 1:0,5) powodowało silniejszą aktywację limfocytów T, niezależnie od temperatury (Publikacja 1, Rycina 5). Podsumowując, w warunkach hodowli *in vitro*

niska lub utrzymująca się przez dłuższy czas wysoka temperatura ogranicza aktywację psich limfocytów T.

4.5. Ocena wpływu aktywacji *in vitro* na indukcję apoptozy i aktywność metaboliczną psich limfocytów T, ich funkcje efektorowe oraz zdolność do nabywania fenotypu komórek pamięci efektorowej

W celu optymalizacji warunków aktywacji oraz hodowli *in vitro* oceniono wpływ różnych ilości mikrokulek magnetycznych MicroBeads na proces indukcji apoptozy limfocytów T po ich aktywacji. Wykazano, że zastosowanie MicroBeads nie powoduje wzrostu odsetka komórek apoptotycznych w populacji, niezależnie od ich stężenia, a wartości te były porównywalne do obserwowanych wśród komórek niestymulowanych. Przeciwnie wyniki uzyskano w przypadku aktywacji indukowanej ConA, gdzie odsetek komórek apoptotycznych był istotnie wyższy w porównaniu zarówno z komórkami niestymulowanymi, jak i aktywowanymi MicroBeads w proporcji 1:0,25 (Publikacja 1, Rycina 6A). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w odsetku komórek martwych między różnymi rodzajami aktywacji, a ich udział nie przekroczył 1,21% w analizowanej populacji komórek. Dodatkowo oceniono aktywność metaboliczną limfocytów T na podstawie redukcji C12-resazuryny (która nie wykazuje fluorescencji) do C12-resorufiny, charakteryzującej się pomarańczową fluorescencją. Wszystkie badane grupy wykazywały wysoką aktywność metaboliczną, bez istotnych różnic pomiędzy metodami stymulacji (Publikacja 1, Rycina 6A).

Podobnie jak u ludzi i myszy, psie limfocyty T nabywają fenotyp pamięci efektorowej po stymulacji i ekspansji *ex vivo*. Profil pamięci limfocytów T określano na podstawie obecności dwóch cząsteczek powierzchniowych: CD44 i CD62L. Pozwoliło to wyróżnić trzy populacje: dziewicze limfocyty T, charakteryzujące się wysokim poziomem wyłącznie cząsteczki CD62L, limfocyty T pamięci centralnej (ang. *central-memory T cells*, T_{CM}), wykazujące zarówno marker CD44 jak i CD62L oraz limfocyty T pamięci efektorowej (ang. *effector-memory T cells*, T_{EM}), charakteryzujące się obecnością na swojej powierzchni jedynie cząsteczki CD44. Analiza cytometryczna przeprowadzona po 20 dniach hodowli *in vitro* wykazała, że aktywacja z zastosowaniem MicroBeads, niezależnie od użytego stężenia, sprzyja powstawaniu limfocytów T o fenotypie pamięci efektorowej (T_{EM}). Ponad 65% stymulowanych komórek wykazywało taki fenotyp, co stanowiło istotnie statystycznie wyższą wartość w porównaniu z komórkami niestymulowanymi. Warto podkreślić, że odsetek

limfocytów T_{EM} w przypadku aktywacji z zastosowaniem MicroBeads był porównywalny do pozytywnej kontroli, którą stanowiły komórki stymulowane ConA, co świadczy o wysokiej skuteczności stymulacji mikrokulkami magnetycznymi (Publikacja 1, Rycina 6B, C).

Za pomocą barwienia wewnątrzkomórkowego oceniono wytwarzanie cytokin efektorowych IFN- γ oraz IL-2 przez limfocyty T. Analiza cytometryczna wykazała, że tylko limfocyty T aktywowane mikrokulkami magnetycznymi MicroBeads charakteryzowały się istotnie wyższym odsetkiem komórek syntetyzujących IFN- γ ($p < 0,001$) w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (Publikacja 1, Rycina 6D, E). W przypadku analizy dotyczącej IL-2 nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między badanymi grupami. Odsetek komórek syntetyzujących tę cytokinę był porównywalny zarówno pomiędzy limfocytami stymulowanymi ConA i MicroBeads, jak również pomiędzy tymi grupami a komórkami niestymulowanymi (Publikacja 1, Rycina 6D, E).

4.6. Badanie wpływu stymulacji komórek na aktywację szlaków sygnałowych

W celu weryfikacji aktywności wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych w stymulowanych psich PBL, oceniono poziom i fosforylację kluczowych białek za pomocą metody Western blot. Dokonano immunodetekcji kinazy p70 S6, zwanej również rybosomalną kinazą białkową S6 β -1 (S6K1), która należy do białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału w komórkach poprzez szlak mTORC1. Aktywacja zarówno przy użyciu MicroBeads, jak i ConA indukowała fosforylację kinazy p70 S6 w limfocytach, co można było zaobserwować już 1 godzinę po stymulacji (Publikacja 1, Rycina 7A).

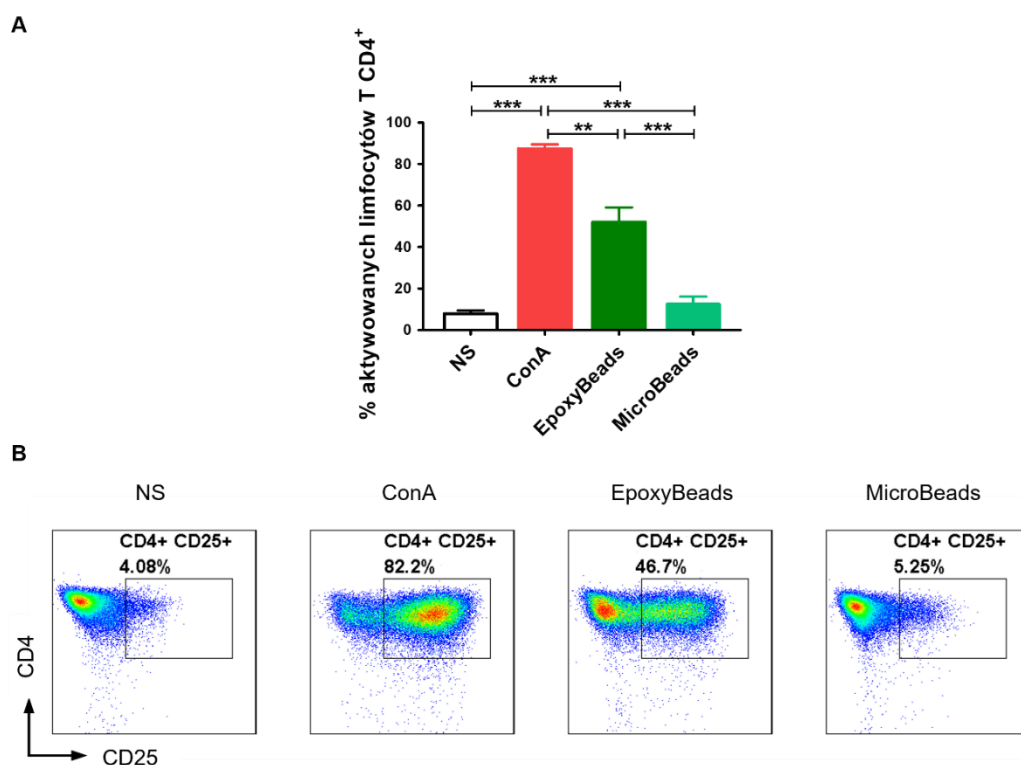
Oceniono również poziom białek uczestniczących w szlakach MAPK, takich jak ERK1/2 i RSK1/2/3. Zaobserwowano zwiększoną fosforylację kinazy p44/42 MAPK (ERK1/2) po aktywacji limfocytów T z wykorzystaniem ConA, podczas gdy aktywacja oparta na MicroBeads indukowała ten proces w mniejszym stopniu (Publikacja 1, Rycina 7B). Ponadto poziom białka RSK1/2/3 był podwyższony zarówno w komórkach stymulowanych ConA, jak i MicroBeads w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (Publikacja 1, Rycina 7B).

Analizując szlak sygnałowy PI3K/Akt w stymulowanych komórkach, wykazano podwyższony poziom kinazy Akt w limfocytach T aktywowanych zarówno ConA, jak i MicroBeads w porównaniu z komórkami niestymulowanymi (Publikacja 1, Rycina 7C).

Ponadto już 15 minut po aktywacji obserwowano indukcję fosforylacji Akt w przypadku obu zastosowanych metod aktywacji (Publikacja 1, Rycina 7D). Stwierdzono również, że aktywacja z zastosowaniem MicroBeads, w przeciwieństwie do stymulacji ConA, indukowała zwiększenie poziomu białka – podjednostki p110 δ kinazy PI3 w limfocytach T (Publikacja 1, Rycina 7D).

4.7. Ocena skuteczności aktywacji limfocytów T pomocniczych z wykorzystaniem mikrokulek magnetycznych EpoxyBeads

Badania opisane w Publikacji 1 obejmowały izolację oraz hodowlę *in vitro* psich PBL. W kolejnych etapach badań skoncentrowano się na izolacji i aktywacji wybranej subpopulacji – psich limfocytów T CD4⁺. Początkowo wyizolowaną subpopulację limfocytów Th aktywowano używając metody opracowanej we wcześniejszym etapie badań, wykorzystującej mikrokulki magnetyczne MicroBeads pokryte przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28 w proporcji 1:0,5. Taka metoda okazała się jednak nieskuteczna w przypadku hodowli komórkowej, którą stanowiła wyłącznie subpopulacja limfocytów Th. Uzyskany odsetek limfocytów T CD4⁺ wykazujących obecność markera aktywacji CD25 wynosił jedynie 12,6 $\pm$ 6,1% i nie różnił się istotnie od komórek niestymulowanych (Rycina 9, dane niepublikowane). Dlatego też podjęto próbę opracowania metody, wykorzystującej inny rodzaj mikrokulek magnetycznych – EpoxyBeads, również opłaszczonych przeciwciałami przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28. Wykazano, że są one dużo skuteczniejsze w aktywacji limfocytów T CD4⁺. Zastosowana proporcja 1:0,5 pozwoliła na uzyskanie istotnie wyższego odsetka komórek aktywowanych zarówno w porównaniu z komórkami niestymulowanymi, jak również z komórkami aktywowanymi z zastosowaniem MicroBeads ($p < 0,001$) (Rycina 9). Na podstawie wyników tego eksperymentu postanowiono zoptymalizować metodę wykorzystującą mikrokulki magnetyczne EpoxyBeads.



Rycina 9. Analiza aktywacji psich limfocytów T CD4⁺

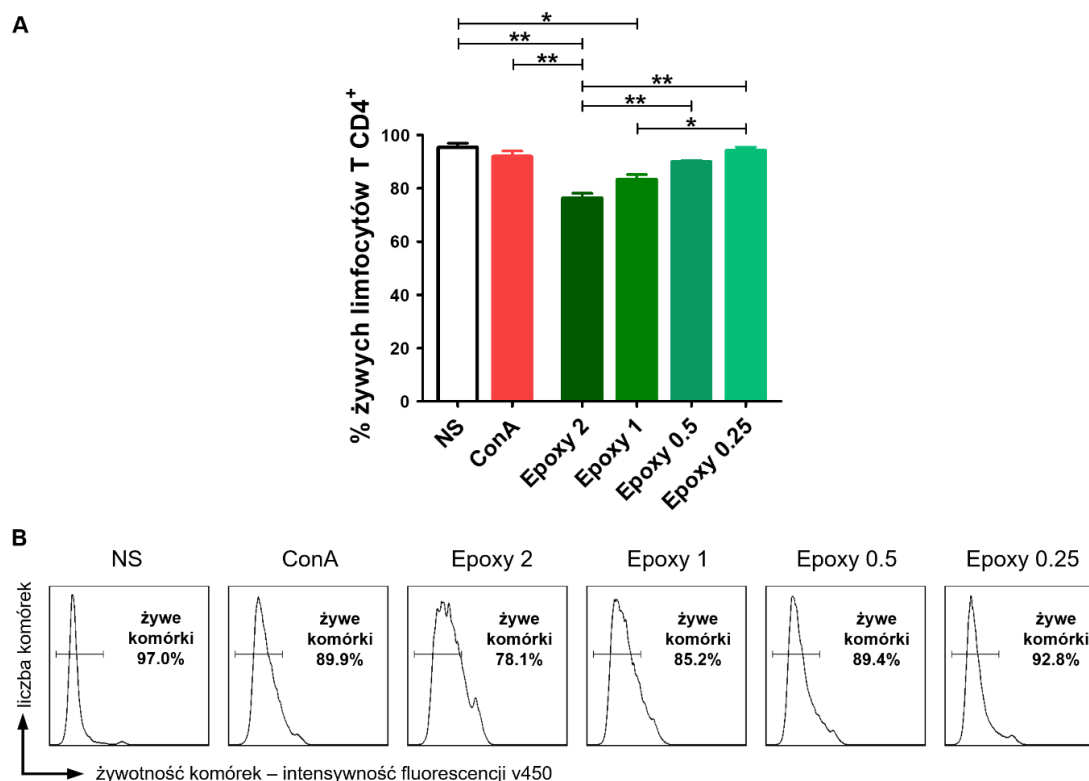
(A) Wykres słupkowy przedstawiający odsetek aktywowanych limfocytów T CD4⁺ wśród komórek niestymulowanych (NS) oraz aktywowanych z użyciem ConA, mikrokulek magnetycznych EpoxyBeads lub MicroBeads. Dane przedstawiono w postaci średnich + SEM (n = 3). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) oraz testu post hoc wielokrotnych porównań Tukeya ($p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

(B) Reprezentatywne cytogramy obrazujące procent limfocytów T CD4⁺ CD25⁺.

W celu optymalizacji metody oraz uzyskania jak najlepszego statusu aktywacji przetestowano różne proporcje EpoxyBeads do limfocytów T (2:1, 1:1, 0,5:1 oraz 0,25:1). Wykazano, że zastosowanie wyższych stężeń EpoxyBeads (w proporcjach 2:1 i 1:1) pozwoliło osiągnąć bardzo wysoki odsetek limfocytów T wykazujących na powierzchni cząsteczkę CD25, porównywalny do efektu uzyskanego po stymulacji ConA (Publikacja 2, Rycina 1D, E). Z kolei limfocyty T CD4⁺ stymulowane niższymi stężeniami EpoxyBeads (proporcje 0,5:1 i 0,25:1) wykazały niższy poziom aktywacji (Publikacja 2, Rycina 1D, E).

Biorąc pod uwagę podobny poziom aktywacji uzyskany podczas zastosowania dwóch najwyższych stężeń EpoxyBeads, przy wyborze warunków do dalszych doświadczeń uwzględniono również przeżywalność komórek w hodowli *in vitro*. Wykazano, że była ona wyższa w przypadku proporcji 1:1 (Rycina 10 A i B

oraz w Publikacji 2, Rycina dodatkowa S1). Na tej podstawie jako optymalne warunki aktywacji przyjęto stosunek 1:1 EpoxyBeads do psich limfocytów T CD4⁺.



Rycina 10. Wpływ stężenia mikrokulek magnetycznych EpoxyBeads na żywotność psich limfocytów T CD4⁺

(A) Wykres słupkowy przedstawiający średni odsetek żywych psich limfocytów T CD4⁺ po 24 godzinach od stymulacji ConA oraz różnymi proporcjami EpoxyBeads. Dane przedstawiono w postaci średnich + SEM (n = 3). Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) oraz testu post hoc wielokrotnych porównań Tukeya (p < 0,05 (*), p < 0,01 (**)). (B) Reprezentatywne cytogramy obrazujące żywotność komórek aktywowanych ConA lub różnymi proporcjami EpoxyBeads do limfocytów T CD4⁺.

4.8. Analiza różnicowania limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17

Kolejnym zadaniem badawczym była ocena możliwości różnicowania wyizolowanych psich limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17. W tym celu przeprowadzono analizę odsetka komórek syntetyzujących IL-17 oraz oceniono poziom czynnika transkrypcyjnego ROR γ t. Dodatkowo określono odsetek limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących IFN- γ . Analiza cytometryczna wykazała, że zastosowanie pożywki różnicującej, zawierającej IL-1 β , IL-6, TGF- β , przeciwciało neutralizujące IL-4, a także IL-2 i IL-23, które dodawane były w trakcie długotrwałej hodowli, prowadziło

do skutecznego różnicowania limfocytów T CD4⁺ w ciągu 10-dniowej hodowli *in vitro* (Publikacja 2, Rycina 2). Co istotne, limfocyty T CD4⁺ aktywowane z wykorzystaniem EpoxyBeads reagowały na warunki różnicujące znacznie skuteczniej niż komórki stymulowane ConA. Efekt ten przejawiał się istotnie wyższym odsetkiem limfocytów T CD4⁺ wykazujących aktywną syntezę IL-17 ($p < 0,001$) (Publikacja 2, Rycina 2A, C). Jednocześnie wśród limfocytów T CD4⁺ aktywowanych przy użyciu EpoxyBeads odsetek komórek produkujących IFN- γ był istotnie niższy ($p < 0,01$) w porównaniu do komórek aktywowanych ConA (Publikacja 2, Rycina 2B, C).

Oceniono również wpływ pożywki różnicującej na poziom czynnika transkrypcyjnego ROR γ t, mierzonego na podstawie średniej intensywności fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*, MFI). W porównaniu z komórkami niestymulowanymi, zarówno limfocyty T CD4⁺ aktywowane EpoxyBeads, jak i ConA wykazywały istotnie wyższy poziom ROR γ t. Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy komórkami aktywowanymi z zastosowaniem tych dwóch metod (Publikacja 2, Rycina 2D, E).

Uzyskane wyniki wykazały, że aktywacja z zastosowaniem EpoxyBeads sprzyja polaryzacji limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17. Dlatego w kolejnych doświadczeniach zastosowano wyłącznie tę metodę stymulacji.

4.9. Określenie wpływu czynników modyfikujących szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina na różnicowanie psich limfocytów Th17

W celu oceny wpływu modulacji szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina na proces różnicowania limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17 sprawdzono zdolność komórek do syntezy IL-17 i IFN- γ oraz zanalizowano poziom czynnika transkrypcyjnego ROR γ t. Komórki hodowano w pożywce różnicującej z dodatkiem indometacyny, XAV939 (inhibitory szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina) lub TWS119 (aktywator tego szlaku).

Analiza cytometryczna wykazała, że obecność indometacyny w pożywce różnicującej prowadziła do istotnego wzrostu odsetka limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących IL-17 ($p < 0,05$) w porównaniu z komórkami kontrolnymi (określanymi w Publikacji 2 jako Ctrl Th17), które stanowiły limfocyty T CD4⁺ aktywowane i hodowane w pożywce różnicującej bez żadnego czynnika modyfikującego szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina (Publikacja 2, Rycina 3A, C). Odmienne efekty uzyskano po zastosowaniu TWS119, który powodował istotne statystycznie obniżenie odsetka

limfocytów T CD4⁺IL-17⁺ w porównaniu z komórkami traktowanymi indometacyną ($p < 0,001$). Zaobserwowano także tendencję spadkową względem komórek kontrolnych (Ctrl Th17), choć bez osiągnięcia istotności statystycznej (Publikacja 2, Rycina 3A, C). Zastosowanie inhibitora XAV939 nie wpłynęło znacząco na polaryzację komórek w kierunku fenotypu Th17 (Publikacja 2, Rycina 3A, C).

Uzyskane wyniki wykazały, że zastosowanie indometacyny, jak również XAV939 nie zmieniło odsetka limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących IFN- γ , który w tych warunkach był na podobnym poziomie jak w przypadku komórek kontrolnych (Publikacja 2, Rycina 3B, C). Dodanie TWS119 spowodowało natomiast istotny statystycznie spadek odsetka limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących IFN- γ (Publikacja 2, Rycina 3B, C).

Równolegle oceniono poziom czynnika transkrypcyjnego ROR γ t. Zarówno kontrolne limfocyty Th17, jak i komórki traktowane indometacyną lub XAV939 wykazywały istotnie wyższy poziom tego białka w porównaniu z komórkami niestymulowanymi ($p < 0,001$). Natomiast dodanie do pożywki różnicującej TWS119 spowodowało istotne statystycznie obniżenie poziomu ROR γ t w porównaniu z kontrolnymi komórkami Th17 ($p < 0,05$) (Publikacja 2, Rycina 3D, E).

4.10. Badanie wpływu różnicowania psich limfocytów T w kierunku fenotypu Th17 na charakterystykę fenotypu komórek pamięci

W celu scharakteryzowania fenotypu komórek pamięci przeanalizowano obecność cząsteczek powierzchniowych CD44 i CD62L w zróżnicowanych komórkach Th17 i na tej podstawie wyróżniono trzy subpopulacje limfocytów T: dziewiczych, T_{CM} oraz T_{EM}.

Analiza cytometryczna wykazała, że ponad 75% kontrolnych limfocytów (Ctrl Th17) nabyło fenotyp komórek T_{EM} (Publikacja 2, Rycina 4A, B). Podobne wyniki zaobserwowano w przypadku komórek traktowanych indometacyną lub XAV939. Średni odsetek komórek T_{CM} w powyższych warunkach (Ctrl Th17, komórki traktowane indometacyną lub XAV939) nie przekraczał 25% (Publikacja 2, Rycina 4A, B). Odmienny efekt uzyskano po zastosowaniu TWS119, co prowadziło do istotnego wzrostu odsetka limfocytów T_{CM} przy jednoczesnym spadku odsetka komórek T_{EM} (Publikacja 2, Rycina 4A, B).

4.11. Analiza aktywności metabolicznej komórek różnicowanych w kierunku fenotypu Th17

Biorąc pod uwagę, że metabolizm limfocytów T zależy od ich zróżnicowania oraz fenotypu pamięci, zanalizowano wpływ polaryzacji w kierunku fenotypu Th17 na masę i aktywność mitochondriów. W tym celu oceniono względną MFI po barwieniu komórek barwnikami MitoTracker i TMRM. Analiza nie wykazała istotnych statystycznie różnic w masie mitochondriów (barwienie MitoTracker) (Publikacja 2, Rycina 5A, B), jak również w potencjale mitochondrialnym (barwienie TMRM) (Publikacja 2, Rycina 5C, D). W obu przypadkach wartości MFI były jedynie nieznacznie wyższe w komórkach zróżnicowanych w kierunku Th17 w porównaniu z komórkami niestymulowanymi. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy komórkami kontrolnymi (Ctrl Th17), a komórkami traktowanymi różnymi modulatorami szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina (Publikacja 2, Rycina 5A-D).

Dokładniejszą analizę metabolizmu limfocytów Th17 przeprowadzono, oceniając kluczowe parametry funkcji mitochondrialnych z wykorzystaniem testu Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Uwzględniono trzy główne parametry: oddychanie podstawowe, oddychanie maksymalne oraz zapasową pojemność oddechową. W zakresie oddychania podstawowego komórki różnicowane w obecności indometacyny wykazywały istotnie wyższą wartość OCR w porównaniu z komórkami kontrolnymi, jak również z komórkami traktowanymi XAV939 lub TWS119 (Publikacja 2, Rycina 5E). Ponadto zastosowanie TWS119 prowadziło do statystycznie istotnego obniżenia wartości OCR względem komórek kontrolnych ($p < 0,001$). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy komórkami traktowanymi XAV939 a kontrolą (Publikacja 2, Rycina 5E). Limfocyty Th17 różnicowane w obecności indometacyny charakteryzowały się także wysokim poziomem OCR w zakresie oddychania maksymalnego. Uzyskane wartości różniły się istotnie w porównaniu z komórkami kontrolnymi oraz traktowanymi TWS119 (Publikacja 2, Rycina 5F). Ostatnim analizowanym parametrem była zapasowa pojemność oddechowa, definiowana jako różnica pomiędzy oddychaniem maksymalnym a podstawowym, odzwierciedlająca zdolność komórki do odpowiedzi na zwiększone zapotrzebowanie energetyczne. Również w przypadku tego parametru zaobserwowano, że limfocyty T $CD4^+$ różnicowane w kierunku fenotypu Th17 i jednocześnie traktowane indometacyną charakteryzowały się istotnie wyższą wartością OCR w porównaniu z komórkami kontrolnymi oraz traktowanymi TWS119 (Publikacja 2, Rycina 5G).

5. Dyskusja

Model psa domowego jest coraz częściej wykorzystywany w medycynie porównawczej. Podobnie jak u ludzi, u psów towarzyszących rozwija się szerokie spektrum chorób alergicznych, autoimmunologicznych oraz nowotworowych. Z tego powodu zastosowanie modelu psa domowego ma szczególną wartość w badaniach klinicznych, obejmujących zarówno poznanie podstaw biologii układu odpornościowego, jak i ocenę skuteczności oraz bezpieczeństwa nowych terapii komórkowych. Ponadto nowotwory rozwijające się u psów, w znacznie większym stopniu niż modele wykorzystujące gryzonie laboratoryjne, odzwierciedlają biologię, genetykę, czy też odpowiedź na leczenie obserwowane w nowotworach ludzkich [193,196,200,204,205]. Analiza przypadków klinicznych u psów wnosi zatem cenne informacje, poszerzające perspektywę badań translacyjnych. Co więcej, włączenie do badań różnych ras psów pozwala uwzględnić naturalną zmienność genetyczną, niedostępną w standardowych modelach wykorzystujących gryzonie laboratoryjne [193]. Należy jednak podkreślić, że w przypadku badań immunologicznych protokoły izolacji, stymulacji, ekspansji i różnicowania limfocytów T izolowanych od psów nie zostały dotąd opracowane i zbadane z taką precyzją, jak w przypadku komórek ludzkich czy mysich, co stanowi istotne wyzwanie dla dalszego rozwoju tej dziedziny.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań, których celem było opracowanie i ocena protokołu skutecznej aktywacji oraz różnicowania psich limfocytów T w warunkach *in vitro*. W pierwszym etapie skupiono się na opracowaniu metody aktywacji z zastosowaniem mikrokulek magnetycznych MicroBeads opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28. Przeanalizowano wpływ stosunku ilościowego zastosowanych mikrokulek magnetycznych MicroBeads i temperatury na proliferację limfocytów T. W kolejnym etapie opracowano protokół pozwalający na skuteczną aktywację i różnicowanie *in vitro* psich limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17. Oceniono potencjalne zastosowanie modulatorów szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina jako czynnika wspomagającego proces różnicowania limfocytów Th17 u psów. Szczególną uwagę poświęcono charakterystyce fenotypu uzyskanych komórek oraz ich aktywności mitochondrialnej. Dodatkowo oceniono opracowane protokoły pod kątem potencjalnego zastosowania w badaniach podstawowych i translacyjnych.

Pierwsze badania opisujące metody stymulacji psich limfocytów T opisują wykorzystanie silnych mitogenów lektynowych, takich jak ConA [206,207] i fitohemaglutynina (ang. *phytohaemagglutinin*, PHA) [208,209] w hodowlach krótkoterminowych. Również w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej wykorzystano ConA jako kontrolę pozytywną aktywacji limfocytów. Jej zastosowanie prowadziło do masowej, nieswoistej aktywacji wszystkich limfocytów T znajdujących się w hodowli. W przypadku hodowli długoterminowych dane literaturowe opisują zastosowanie rozpuszczalnych bądź unieruchomionych na płycie przeciwciał skierowanych wyłącznie przeciwko psiej cząsteczce CD3 [210–212] lub w połączeniu z przeciwciałami skierowanymi przeciwko psiej cząsteczce CD28 [213]. Jednak w celu skutecznej aktywacji niezbędne jest dostarczenie limfocytom T dwóch sygnałów stymulujących w obrębie specyficznej struktury, jaką jest synapsa immunologiczna. Takie warunki mogą być zapewnione poprzez wykorzystanie APC. W badaniach nad ludzkimi limfocytami T stymulację *ex vivo* przeprowadza się przy użyciu różnych typów APC [181]. Dotychczas opracowane protokoły ekspansji ludzkich limfocytów T wykorzystują naturalne komórki dendrytyczne, różnicowane z monocytów krwi obwodowej pacjentów. Innym powszechnie stosowanym podejściem jest wykorzystanie nieśmiertelnionej ludzkiej erytroleukemicznej linii K562, pełniącej rolę aAPC [181]. Komórki K562 wykazują obecność cząsteczek adhezyjnych, umożliwiających tworzenie i utrzymanie synapsy immunologicznej i przekazywanie sygnału aktywującego. Mogą one być dodatkowo modyfikowane genetycznie w celu prezentacji licznych cząsteczek kostymulujących oraz syntezy cytokin [182]. Ponadto ludzkie limfocyty T mogą być również bardzo skutecznie namnażane przy użyciu mikrokulek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28. Co ważne, możliwe jest wykorzystanie różnych cząsteczek kostymulujących, innych niż CD28, tak aby dostarczać najbardziej korzystny sygnał dla określonych subpopulacji limfocytów T (np. kostymulacja zależna od ICOS sprzyja różnicowaniu komórek Th17) lub wspierać przeciwnowotworowe właściwości limfocytów T w adoptywnej terapii komórkowej [181,183,184,214,215].

W medycynie weterynaryjnej O'Connor i współpracownicy (2012) [216] jako pierwsi wykorzystali aAPC w celu aktywacji psich limfocytów T pochodzących z krwi obwodowej zdrowych dawców oraz psów chorych na chłoniaka nieziarniczego. Wykorzystane ludzkie komórki K562 prezentowały przeciwciała skierowane przeciwko ludzkim cząsteczkom CD3 oraz zestaw ludzkich cząsteczek kostymulujących

i adhezyjnych. Takie podejście pozwoliło uzyskać wystarczającą liczbę komórek do zastosowania w adoptywnej immunoterapii [216]. Metoda ta była następnie udoskonalana. Mata i współpracownicy (2014) [217] opracowali procedurę ekspansji psich PBMC, wykorzystując dodatkowo mitogen PHA oraz ludzką rekombinowaną IL-21, co umożliwiło skuteczną ekspansję psich limfocytów w warunkach *in vitro*. Z kolei Panjwani i współpracownicy (2016, 2019) [202,203] zastosowali komórki K562 prezentujące przeciwciała przeciwko psiej cząsteczce CD3, zmodyfikowane genetycznie w celu prezentacji psiej cząsteczki CD86. Takie podejście pozwoliło na znaczną ekspansję limfocytów T pochodzących zarówno od zdrowych psów, jak i od pacjentów z chłoniakiem z limfocytów B [202].

Pomimo że wykorzystanie komórek K562 okazało się skuteczne w aktywacji i ekspansji limfocytów, metoda ta posiada istotne ograniczenia, które utrudniają jej powszechne stosowanie w medycynie weterynaryjnej [181]. Wynika to przede wszystkim z faktu, że linia K562 pochodzi z ludzkiego nowotworu złośliwego [182], a komórki te muszą być każdorazowo napromieniane przed wspólną hodowlą z PBMC. Chociaż po ekspansji limfocytów T nie wykryto komórek K562, a same komórki nie stanowią zagrożenia dla psów i spełniają standardy konieczne do zastosowań klinicznych, ich podanie psim pacjentom może budzić uzasadnione obawy m.in. ze względu na nadmierną immunogenność ludzkich komórek względem układu odpornościowego psów [182]. Dodatkowo protokół aktywacji, który wymaga napromieniowania komórek K562 przed użyciem w hodowli *in vitro* sprawia, że procedura ta jest trudnodostępna i bardzo rzadko stosowana w klinikach oraz laboratoriach weterynaryjnych [218]. W związku z tym obiecującą alternatywą wydaje się zastosowanie mikrokulek magnetycznych. Metoda ta jest znacznie bardziej dostępna, nie wymaga specjalistycznego wyposażenia laboratoryjnego, a jednocześnie stanowi opcję przystępną finansowo.

Mason i współpracownicy zastosowali metodę wykorzystującą epoksydowane kulki magnetyczne (określane w ich pracach jako Dynabeads) [202,203,219]. Autorzy porównali skuteczność aktywacji psich limfocytów przy użyciu ConA, sztucznych komórek prezentujących antygen K562 oraz mikrokulek magnetycznych Dynabeads pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28. Najwyższy stopień proliferacji i ekspansji limfocytów T uzyskano po stymulacji z wykorzystaniem aAPC. Za taki efekt były odpowiedzialne wydzielane czynniki i interakcje z cząstkami adhezyjnymi w obrębie synapsy immunologicznej. Skuteczność

aktywacji z zastosowaniem Dynabeads była jednak silnie zależna od dawcy – w części przypadków uzyskiwano zadowalające wyniki, natomiast u innych stymulacja nie przynosiła oczekiwanych efektów [202]. Najnowsze badania wykazały jednak istotną zaletę aktywacji za pomocą Dynabeads. Limfocyty T aktywowane w ten sposób charakteryzowały się wyższą skutecznością transdukcji lentiwirusowej, co podkreśla potencjał tej metody w rozwoju terapii wykorzystującej zmodyfikowane limfocyty T (CAR-T). Ponadto komórki CAR-T aktywowane w ten sposób wykazywały silną aktywność przeciwnowotworową po podaniu psom ze spontanicznie rozwijającym się chłoniakiem rozlanym z dużych limfocytów B [203].

Warto podkreślić, że podobne obserwacje poczyniono w badaniach klinicznych u ludzi, gdzie limfocyty niektórych pacjentów nie odpowiadały na sygnał przekazywany przez mikrokulki magnetyczne [220]. Mimo to protokół aktywacji oparty na wykorzystaniu mikrokulek magnetycznych uznano za wysoce użyteczny w aplikacjach klinicznych zatwierdzonych przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA), a metoda ta jest obecnie szeroko stosowana w badaniach klinicznych dotyczących uzyskania limfocytów CAR-T swoistych wobec nowotworów [214,220,221].

W przedstawionych w pracy doktorskiej badaniach wykazano, że zastosowanie mikrokulek magnetycznych Microbeads pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko psim cząsteczkom CD3 i CD28 skutecznie aktywuje limfocyty T wyizolowane z krwi obwodowej zdrowych dawców oraz wspiera ich proliferację i funkcje efektorowe. W badaniach nad limfocytami ludzkimi wykazano, że optymalizacja stosunku liczby limfocytów T do mikrokulek magnetycznych stanowi istotny etap opracowywania protokołów ekspansji. Pozwala ograniczyć anergię limfocytów T, zachować wysoką żywotność komórek, a także obniżyć koszty hodowli *ex vivo* [183,184]. Nasz artykuł opublikowany w 2021 roku był pierwszą pracą, w której określono optymalne stężenie MicroBeads dla limfocytów psich. Wykazano, że stosunkowo niskie stężenie MicroBeads (podawanych w proporcji limfocyty T do mikrokulek MicroBeads: 1:0,5 oraz 1:0,25) sprzyjało wydajnej proliferacji limfocytów T, a także nabywaniu fenotypu pamięci efektorowej.

Pomimo że w przypadku aktywacji i ekspansji psich limfocytów T stosowano wyższe proporcje limfocytów T do mikrokulek magnetycznych [202], uzyskane wyniki są zgodne z obserwacjami dotyczącymi ludzkich PBMC. Badania te wykazały, że zastosowanie mniejszej liczby mikrokulek może wspierać przeżywalność komórek

i lepiej stymulować limfocyty T do proliferacji [183,184]. Naukowcy określili, że optymalny stosunek PBMC do mikrokulek pokrytych przeciwciałami wynosi 1:0,5, co jest zgodne z wynikami opisanymi w niniejszej rozprawie doktorskiej (Publikacja 1) [184]. Wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej wykazały, że dostarczony przez mikrokulki magnetyczne MicroBeads pierwszy i drugi sygnał stymulujący okazał się wystarczający do osiągnięcia wysokiego odsetka komórek aktywowanych oraz efektywnej ekspansji limfocytów T. Wyniki te potwierdzają, że psie limfocyty T reagują na różną siłę sygnału aktywującego w sposób zbliżony do komórek ludzkich, co ma istotne znaczenie dla dalszych badań immunologicznych w kontekście chorób nowotworowych i zakaźnych.

W celu dalszej optymalizacji procesu aktywacji psich limfocytów T w warunkach *in vitro* prowadzono hodowle komórek w różnych temperaturach, w zakresie od 33°C do 41°C. Analiza cytometryczna poziomu markera aktywacji wykazała, że najwyższy odsetek aktywowanych limfocytów T uzyskano w temperaturze 38,5°C, odpowiadającej średniej fizjologicznej temperaturze ciała psa [222]. Hodowla komórek w 37°C i 40°C nie powodowała istotnych różnic w poziomie CD25 w porównaniu z temperaturą 38,5°C, co sugeruje, że limfocyty psów mogą być hodowane również w tych warunkach. Nasze obserwacje wskazują jednak, że chociaż świeżo izolowane komórki można skutecznie aktywować w 37°C, limfocyty T poddane wcześniej zamrożeniu nie ulegały aktywacji w tej temperaturze (dane niepublikowane). Ponadto odnotowano trudności w hodowli komórek w wyższych temperaturach (40-41°C). Przypuszczamy, że podobnie jak u ludzi, stres cieplny uwrażliwia limfocyty T na apoptozę indukowaną przez receptor Fas [223], choć niezbędne są dalsze badania, w celu pełnego wyjaśnienia tego zjawiska u psów. W naszych doświadczeniach limfocyty T były najskuteczniej namnażane w temperaturze 37-38,5°C. W literaturze jedynie Mata i współpracownicy (2014) [217] prowadzili hodowle psich limfocytów CAR-T w temperaturze 38,5°C w celu ich zastosowania w ACT, podczas gdy większość badań dotyczących hodowli *in vitro* psich limfocytów T realizowano w standardowej temperaturze inkubacji wynoszącej 37°C [203,206,216, 224,225], co również uznaliśmy za warunki optymalne w badaniach immunologicznych u psów. Co istotne, nasze obserwacje są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi komórek mysich i ludzkich, które wykazały, że niższa temperatura, wynosząca 33°C, znacząco osłabia aktywację limfocytów T [226].

Po rozpoznaniu obcego antygeny *in vivo* proliferacja i różnicowanie limfocytów T są regulowane m.in. przez śmierć komórek na drodze apoptozy. Istotną rolę odgrywa

w tym procesie zjawisko AICD [227,228]. Sygnał przekazywany za pośrednictwem TCR wspiera przeżycie limfocytów T, ale równocześnie może inicjować szereg procesów prowadzących do zaprogramowanej śmierci komórki. Obejmują one m.in. zaangażowanie receptora śmierci Fas (CD95) i jego ligandu (CD95L), hamowanie aktywności białek antyapoptotycznych oraz aktywację kaskady kaspaz [227,228]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że aktywacja z wykorzystaniem mikrokulek magnetycznych MicroBeads, w przeciwieństwie do ConA, nie zwiększa poziomu apoptozy w trakcie aktywacji i umożliwia zachowanie wysokiej aktywności metabolicznej komórek. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że mikrokulki magnetyczne MicroBeads dostarczają kostymulacji angażującej cząsteczkę CD28. W badaniach z udziałem komórek ludzkich wykazano, że zaangażowanie CD28 ogranicza apoptozę, głównie poprzez aktywację szlaku PI3K/Akt oraz zwiększenie poziomu białek antyapoptotycznych Bcl-2 i Bcl-xL [163,227].

W badaniach dotyczących ekspansji ludzkich limfocytów T CD4⁺ wykazano większą skuteczność aktywacji z użyciem mikrokulek magnetycznych w porównaniu ze stymulacją wyłącznie rozpuszczalnym przeciwciałem anti-CD3. Skuteczność dotyczyła zarówno tempa proliferacji, jak i wydzielania cytokin, takich jak IFN- γ i TNF- α [229]. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazały, że aktywacja psich PBL przy użyciu mikrokulek magnetycznych MicroBeads sprzyja powstawaniu komórek T_{EM} oraz znacząco zwiększa syntezę IFN- γ . Dane dotyczące funkcjonalności aktywowanych limfocytów T stanowią istotną wartość w kontekście namnażania limfocytów T w zastosowaniach klinicznych, mających na celu ich wykorzystanie w immunoterapii komórkowej.

Aktywacja limfocytów T inicjuje szereg wewnątrzkomórkowych procesów prowadzących do przejścia komórek z uśpionej fazy G0 do G1 cyklu komórkowego. Oprócz wydzielania IL-2 oraz zwiększonego poziomu receptora IL-2, zmiany te obejmują przede wszystkim modyfikacje w zakresie fosforylacji oraz syntezy białek, wchodzących w skład aktywowanych ścieżek sygnałowych. Przeanalizowano poziom wybranych białek należących do wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych z udziałem kinaz: mTORC, MAPK i PI3K/Akt w limfocytach T po aktywacji za pomocą mikrokulek magnetycznych MicroBeads i stymulacji ConA. Wykazano, że podobnie jak w komórkach ludzkich [159], MicroBeads indukują fosforylację białek należących do szlaku PI3K, w tym podjednostki p110 δ kinazy PI3. W przypadku szlaku MAPK zaobserwowano, że jedynie zastosowanie ConA doprowadziło do wyraźnej aktywacji

ERK1 i ERK2. Białka te fosforylują i aktywują białka docelowe, w tym kinazy rybosomalne S6 (RSK). Zarówno ERK1/2, jak i RSK1/2 mogą także ulegać translokacji do jądra komórkowego, gdzie powodują aktywację transkrypcji genów, w tym czynników transkrypcyjnych kontrolujących cykl komórkowy, przeżycie komórki oraz jej różnicowanie [230]. W przeciwieństwie do ConA, stymulacja za pomocą mikrokulek magnetycznych MicroBeads indukowała fosforylację ERK1/2 w znacznie mniejszym stopniu. Obserwowany niższy poziom fosforylacji może wynikać ze wzmożonej aktywacji fosfataz o podwójnej specyficzności (ang. *MAP kinase phosphatase*, MKP), które inaktywują kinazy ERK1/2 [231]. Proces ten może zachodzić już po 30 minutach od stymulacji komórek. Utrzymujący się wysoki poziom ufosforylowanej formy kinaz ERK1/2 po godzinie od stymulacji ConA potwierdza bardzo silną aktywację wywołaną tym niespecyficznym mitogenem roślinnym. W przypadku aktywacji z użyciem mikrokulek magnetycznych MicroBeads zasadne byłoby przeanalizowanie poziomu fosforylacji kinaz ERK1/2 w krótszych przedziałach czasowych [232,233]. Aktywacja z zastosowaniem MicroBeads indukowała fosforylację kinazy p70 S6, niezbędnej dla aktywności kinazy białkowej zależnej od 3-fosfatydyloinozytolu (ang. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase*, PDK1). PDK1 odgrywa kluczową rolę w aktywacji limfocytów T, inicjując tworzenie kompleksu sygnałowego w odpowiedzi na zaangażowanie CD28 [234].

W opisanym powyżej etapie badań zoptymalizowano warunki hodowli *in vitro* psich PBL poprzez opracowanie metody aktywacji z zastosowaniem mikrokulek magnetycznych MicroBeads, określenie ich optymalnego stężenia, a także analizę kluczowych parametrów, takich jak m.in. wpływ na proliferację, nabywanie fenotypu efektorowego czy syntezę cytokin. Dodatkowo określono optymalną temperaturę hodowli psich limfocytów. Opracowane protokoły stanowiły podstawę do kolejnych analiz, związanych z różnicowaniem limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17.

Co istotne, w pierwszym etapie doświadczeń, opisanych w Publikacji 1, hodowla komórkowa obejmowała PBL. Zastosowanie mikrokulek magnetycznych MicroBeads skutkowało istotnie wyższym odsetkiem aktywowanych limfocytów T w porównaniu z komórkami niestymulowanymi. Takiego efektu nie uzyskano w przypadku użycia mikrokulek magnetycznych Dynabeads (określanych także jako EpoxyBeads). Dlatego też w pierwszym etapie badań odstąpiono od dalszych doświadczeń z ich wykorzystaniem. Ponadto sądzono, że uzyskanie najlepszych wyników przy stosunkowo niskim stężeniu MicroBeads mogło wynikać właśnie z zastosowania

innego rodzaju mikrokulek magnetycznych niż w pracach naukowych, opisujących skuteczność znacznie wyższych proporcji. Mikrokulki magnetyczne MicroBeads mają średnicę około 50 nm, są więc blisko 90-krotnie mniejsze od mikrokulek Dynabeads (4,5 μm średnicy), co może pozwalać im lepiej naśladować strukturę synapsy immunologicznej.

W drugim etapie badań, opisanych w Publikacji 2, przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem wyizolowanej subpopulacji limfocytów T CD4⁺. W tym przypadku aktywacja z wykorzystaniem mikrokulek magnetycznych MicroBeads nie przyniosła zadowalających rezultatów. Dlatego konieczna była modyfikacja metody aktywacji, tak aby zapewnić odpowiednią wydajność. W tym celu ponownie wypróbowano epoksydowane mikrokulki magnetyczne EpoxyBeads (określane w pracach innych badaczy jako Dynabeads), które tym razem okazały się znacznie skuteczniejsze. Uzyskano istotnie wyższy odsetek limfocytów T CD4⁺ aktywowanych mikrokulkami magnetycznymi EpoxyBeads w porównaniu z MicroBeads. Dodatkowo optymalizacja proporcji mikrokulek EpoxyBeads do limfocytów T CD4⁺ wykazała, że wyższe stężenia (2:1 oraz 1:1) sprzyjają aktywacji, co jest zgodne z obserwacjami Panjwani i wsp. (2016) [202]. Wyniki te były więc odmienne od uzyskanych w przypadku hodowli PBL, co sugeruje, że optymalna metoda aktywacji może zależeć od rodzaju komórek obecnych w hodowli *in vitro*. Interesującym kierunkiem dalszych badań, byłaby analiza mechanizmów warunkujących te różnice w odpowiedzi komórek.

Kolejnym etapem badań była analiza możliwości różnicowania w warunkach *in vitro* psich limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17. Uzyskane wyniki wykazały, że aktywowane limfocyty T CD4⁺ mogą różnicować się w kierunku Th17 w obecności odpowiedniej pożywki różnicującej zawierającej IL-1 β , IL-6, TGF- β oraz przeciwciała skierowane przeciwko psiej IL-4. W długoterminowej hodowli dodatkowo stosowano dodatek IL-2, wspierającej proliferację komórek, oraz IL-23, która stabilizuje właściwości fenotypowe komórek Th17 i zwiększa ich przeżywalność [85]. Takie warunki hodowli *in vitro* sprzyjały różnicowaniu w kierunku fenotypu Th17, co potwierdził wyraźnie zwiększony odsetek limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących IL-17. Co istotne, aktywacja z zastosowaniem mikrokulek magnetycznych EpoxyBeads dodatkowo zwiększała skuteczność różnicowania. Odsetek limfocytów T CD4⁺IL-17⁺ był wyraźnie wyższy w porównaniu z hodowlą, w której do stymulacji użyto ConA. Ponadto wykazano, że metoda oparta na EpoxyBeads sprzyjała uzyskaniu fenotypu Th17 poprzez istotne obniżenie wytwarzania IFN- γ w porównaniu z komórkami

aktywowanymi ConA. Wyniki te wskazują, że o skuteczności różnicowania decyduje nie tylko skład pożywki, ale także zastosowana metoda aktywacji limfocytów T CD4⁺.

W literaturze dostępne są jedynie nieliczne doniesienia dotyczące różnicowania psich limfocytów T w kierunku Th17. Ritt i wsp. (2015) [235] przeanalizowali wpływ cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, TGF- β) na wytwarzanie IL-17. Uzyskali oni umiarkowany wzrost odsetka komórek wydzielających IL-17, przy czym wyniki były zróżnicowane pomiędzy dawcami. Maksymalnie uzyskano 12,4% limfocytów T CD4⁺IL-17⁺ oraz 17,6% limfocytów T CD8⁺IL-17⁺. W innym badaniu wykazano, że zastosowanie pożywki zawierającej IL-1 β , IL-6, TGF- β i przeciwciała przeciwko psiej IL-4 umożliwiło uzyskanie niemal 30% komórek syntetyzujących IL-17 [236]. W obu wspomnianych badaniach aktywację limfocytów T przeprowadzano za pomocą ConA [235,236].

Podczas opracowywania optymalnego składu pożywki różnicującej napotkano również pewne trudności. Limfocyty Th17 charakteryzują się znaczną plastycznością fenotypową i mogą nabywać właściwości komórek Th1, w tym zdolność do intensywnej syntezy IFN- γ . Zjawisko to opisywano zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [86]. W związku z tym, w protokołach różnicowania ludzkich i mysich limfocytów Th17 stosuje się przeciwciała neutralizujące IFN- γ , aby zapobiec transformacji komórek w kierunku fenotypu Th1-podobnego. Dlatego też, w ramach niniejszych badań, przetestowano pożywkę wzbogaconą o przeciwciała skierowane przeciwko IFN- γ , jednak nie zaobserwowano zmniejszenia wytwarzania IFN- γ przez limfocyty T CD4⁺ (dane nieopublikowane). Z tego względu przeciwciała to nie zostało uwzględnione w końcowym składzie pożywki różnicującej. Biorąc pod uwagę możliwość obecności komórek o fenotypie Th1-podobnym, podjęto próbę określenia odsetka tej subpopulacji poprzez analizę obecności czynnika transkrypcyjnego T-bet, charakterystycznego dla komórek Th1. Niestety, ograniczona dostępność przeciwciał swoistych wobec komórek psich uniemożliwiła przeprowadzenie tego rodzaju analizy. Niemniej jednak zastosowanie opracowanej pożywki różnicującej w połączeniu z aktywacją przy użyciu EpoxyBeads pozwoliło uzyskać najwyższy dotychczas opisany w literaturze odsetek psich limfocytów Th17. Tworząc protokół różnicowania, uwzględniono jego potencjalne zastosowanie w uzyskiwaniu limfocytów przeznaczonych do adoptywnego transferu komórek (ACT). Limfocyty Th17 wykazują szereg cech szczególnie pożądanых w kontekście ACT, takich jak dłuższa przeżywalność w organizmie, zdolność do samoodnowy oraz zmniejszona podatność na procesy starzenia [86]. Właściwości

te uważa się za istotne dla aktywności przeciwnowotworowej limfocytów Th17 w terapiach wykorzystujących ACT, a zdolność do wytwarzania IFN- γ może dodatkowo je wzmacniać, co potwierdzono wcześniej w badaniach na modelach mysich [237].

Na podstawie badań przeprowadzonych na ludzkich [238] i mysich [237] limfocytach T wysunięto hipotezę, że modyfikacja szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina może sprzyjać różnicowaniu psich limfocytów Th17 w warunkach *in vitro*. We wcześniej wykazano, że szlak ten wspiera samoodnowę i multipotencjalność komórek macierzystych układu krwiotwórczego oraz reguluje rozwój tymocytów [239–242]. Ponadto szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina odgrywa złożoną rolę nie tylko w procesie dojrzewania limfocytów T, lecz także w różnicowaniu dojrzałych komórek T w tkankach obwodowych [243,244].

W badaniach przedstawionych w pracy doktorskiej przeanalizowano wpływ trzech czynników modulujących szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina: indometacyny, XAV939 i TWS119. Indometacyna, mimo że nie jest swoistym inhibitorem szlaku Wnt/ β -katenina, obniża poziom transkrypcji β -kateniny i nasila degradację tego białka [58]. XAV939 hamuje szlak sygnałowy poprzez wiązanie się z tankyrasą i stabilizację białka Axin, które jest kluczowym elementem kompleksu degradującego β -kateninę. Stabilizacja białka Axin nasila fosforylację i degradację β -kateniny oraz ogranicza jej gromadzenie w jądrze komórkowym, co skutkuje spadkiem poziomu transkrypcji genów docelowych [245,246]. Z kolei TWS119 blokuje kinazę GSK-3 β , aktywując tym samym szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina i powodując akumulację oraz translokację β -kateniny do jądra [247].

Uzyskane wyniki wykazały, że zastosowanie dodatku indometacyny do pożywki różnicującej prowadzi do wyraźnego wzrostu odsetka psich limfocytów T CD4⁺ wytwarzających IL-17 w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Podobny efekt wcześniej opisano dla mysich limfocytów T [237]. W badaniach przeprowadzonych na psich limfocytach przez Kol i współpracowników (2016) [236] nie uzyskano jednak porównywalnych rezultatów, co prawdopodobnie wynikało z zastosowania znacznie niższego stężenia indometacyny niż w niniejszym protokole. W przypadku drugiego inhibitora, XAV939, nie zaobserwowano istotnego wpływu na analizowane parametry. Różnice te mogą wynikać z odmiennych mechanizmów działania dwóch zastosowanych inhibitorów wobec β -kateniny. Indometacyna, jest klasycznym niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym, hamującym aktywność cyklooksygenaz COX-1 i COX-2, prowadząc do zahamowania syntezy prostaglandyn [248]. W literaturze wykazano hamujący wpływ

prostaglandyn (PGE₂) na różnicowanie ludzkich i mysich Th17 [249], jednak badania Kol i współpracowników (2016) [236] na komórkach psich nie potwierdziły tego efektu. Z tego względu potencjalny wpływ indometacyny na różnicowanie limfocytów T poprzez mechanizm zahamowania szlaku syntezy prostaglandyn nie został rozważany w niniejszej pracy. Badania wykazały, że oprócz hamującego wpływu indometacyny na aktywność cyklooksygenaz oraz szlaku Wnt/ β -katenina [250–252], cząsteczka ta moduluje również inne szlaki sygnałowe, m.in. NF- κ B [253,254] i PI3K/Akt [255], co może przyczyniać się do regulacji różnicowania komórek. Wyniki doświadczeń przedstawionych w pracy doktorskiej wykazały, że zastosowanie indometacyny znacząco nasila różnicowanie limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17, zwiększając zarówno wytwarzanie IL-17, jak i poziom czynnika transkrypcyjnego ROR γ t. Odmienny efekt zaobserwowano po zastosowaniu aktywatora szlaku Wnt/ β -katenina, TWS119, który istotnie hamował różnicowanie komórek T CD4⁺. Odsetek limfocytów T CD4⁺ syntetyzujących IL-17 oraz wykazujących ROR γ t ulegał obniżeniu względem kontroli, choć różnice te nie zawsze osiągały poziom istotności statystycznej ze względu na zmienność wyników pomiędzy poszczególnymi dawkami. W porównaniu z komórkami traktowanymi indometacyną spadek ten był jednak istotny. Dodatkowo, odsetek limfocytów T CD4⁺ wytwarzających IFN- γ był w tej grupie istotnie niższy niż we wszystkich pozostałych warunkach. Otrzymane wyniki badań własnych wskazują na istotną rolę modulacji aktywności szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina w regulacji różnicowania limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17. Sugerują również, że stymulujący wpływ indometacyny na różnicowanie limfocytów Th17 wynika z zahamowania przez tę cząsteczkę szlaku Wnt/ β -katenina.

Badania nad różnicowaniem psich limfocytów Th17 z zastosowaniem modulatorów szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina nie były dotąd publikowane. Wyniki badań na modelach mysich potwierdzają jednak, że TWS119 hamuje różnicowanie limfocytów T. Gattinoni i wsp. (2009) [256] wykazali jego hamujący wpływ na różnicowanie i funkcję mysich limfocytów Tc. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach prowadzonych na ludzkich limfocytach T z krwi obwodowej i pępowinowej, gdzie obserwowano zahamowanie różnicowania, któremu towarzyszył spadek odsetka komórek syntetyzujących IFN- γ do poziomu bardzo zbliżonego do tego, który przedstawiono w badaniach w pracy doktorskiej [243]. Muralidharan i współpracownicy (2011) [243] ocenili poziom czynników transkrypcyjnych oraz wytwarzanie cytokin charakterystycznych dla różnych subpopulacji limfocytów T,

w tym komórek Th17. Zaobserwowali obniżenie poziomu ROR γ t i IL-17 po traktowaniu TWS119. Co istotne, analiza pozostałych parametrów sugeruje, że TWS119 nie wpływa wybiórczo na określoną subpopulację, lecz raczej wykazuje działanie hamujące na różnicowanie wszystkich subpopulacji limfocytów T [243].

Badania wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej miały również na celu analizę fenotypu pamięci psich limfocytów T CD4⁺ różnicowanych w warunkach *in vitro*. Otrzymane wyniki wykazały wysoki odsetek limfocytów T_{EM} (powyżej 75%) po różnicowaniu komórek zarówno w samej pożywce różnicującej, jak również po zastosowaniu inhibitorów szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina (indometacyny lub XAV939). Wyniki te wskazują, że psie limfocyty T CD4⁺, odpowiednio aktywowane i hodowane w warunkach sprzyjających różnicowaniu, nabywają fenotyp efektorowy, charakteryzujący się migracją do tkanek obwodowych i zdolnością do szybkiej realizacji funkcji efektorowych [257]. Dodatek indometacyny lub XAV939 nie wpływał istotnie na ten proces. Jak dotąd brak jest badań opisujących wpływ modulacji szlaku Wnt/ β -katenina na fenotyp pamięci limfocytów T u psów. Podobne zjawisko zaobserwowano natomiast w przypadku mysich i ludzkich limfocytów T, gdzie podczas różnicowania obserwowano wzrost poziomu cząsteczki CD44 przy równoczesnej utracie cząsteczki CD62L [258].

Odmienny efekt zaobserwowano po zastosowaniu TWS119, aktywatora szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina, który powodował wyraźny wzrost odsetka limfocytów T_{CM} przy jednoczesnym spadku liczby limfocytów T_{EM}. W kilku pracach badawczych wykazano, że TWS119 hamuje różnicowanie ludzkich i mysich limfocytów T [243,256], między innymi ograniczając różnicowanie limfocytów T CD8⁺ i powstawanie komórek efektorowych [256]. Zastosowanie TWS119 prowadziło do zwiększenia odsetka limfocytów zachowujących marker CD62L, charakterystyczny dla limfocytów T dziewiczych oraz T_{CM} [256]. Wyniki te wskazują, że szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina pełni funkcję negatywnego regulatora różnicowania limfocytów T u ludzi i myszy [243,256]. Potwierdzają to także wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej, zgodnie z którymi dodatkowa aktywacja tego szlaku hamuje proces różnicowania psich limfocytów T.

W ostatnich latach wiele badań koncentrowało się na tym, w jaki sposób aktywność, etap różnicowania oraz fenotyp pamięci wpływają na metabolizm limfocytów T [259–262]. W niniejszej pracy oceniono również wpływ różnicowania w kierunku fenotypu Th17 na masę i aktywność mitochondriów w limfocytach T CD4⁺. Analiza

przeprowadzona metodą cytometrii przepływowej wykazała jedynie nieznaczny wzrost zawartości masy mitochondrialnej oraz potencjału błonowego we wszystkich warunkach eksperymentalnych w porównaniu z komórkami niestymulowanymi, przy czym różnice te nie osiągnęły istotności statystycznej.

Aby dokładniej przeanalizować sposób wykorzystania energii przez limfocyty Th różnicowane w kierunku Th17, przeprowadzono pomiar poziomu zużycia tlenu w czasie rzeczywistym. Dodatek indometacyny prowadził do najwyższego poziomu różnicowania psich komórek Th17, co znalazło odzwierciedlenie we wzroście wartości OCR. Komórki te charakteryzowały się najbardziej wydajną fosforylacją oksydacyjną (OXPHOS), pod względem wszystkich analizowanych parametrów, tj. oddychania podstawowego, maksymalnego i zapasowej pojemności oddechowej. Odmienny efekt obserwowano po zastosowaniu TWS119, które powodowało istotne obniżenie wartości OCR we wszystkich wymienionych parametrach.

Uzyskane wyniki sugerują, że indometacyna, między innymi poprzez hamowanie szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina i zwiększenie odsetka komórek Th17, prowadzi do zmiany metabolizmu komórek na korzyść fosforylacji oksydacyjnej. Wiadomo, że limfocyty T wykorzystują odmienne szlaki metaboliczne w zależności od etapu różnicowania i fenotypu pamięci [259–262]. Dziewicze limfocyty T oraz limfocyty T_{CM} wykorzystują głównie fosforylację oksydacyjną, aby utrzymać stan spoczynkowy. Natomiast po kontakcie z antygenem, różnicowaniu komórek w fenotypy efektorowe towarzyszy przełączenie metabolizmu na glikolizę, co umożliwia wydajne wydzielanie cytokin. Wyniki badań uzyskane podczas analizy limfocytów Th17 wskazują na częściową rozbieżność z tym schematem, ponieważ wykazano, że psie limfocyty Th17 o fenotypie T_{EM} wykorzystywały głównie fosforylację oksydacyjną. Doniesienia literaturowe sugerują jednak, że limfocyty T_{EM} korzystają zarówno z glikolizy, jak i z mitochondrialnego łańcucha oddechowego w celu wytwarzania energii, co pozwala im szybko reagować na ponowny kontakt z antygenem poprzez wydzielanie cytokin efektorowych [259]. Co więcej, najnowsze badania wskazują, że w trakcie rozwoju limfocyty Th17 gwałtownie zwiększają intensywność fosforylacji oksydacyjnej, a proces ten jest niezbędny do przeprogramowania metabolicznego po aktywacji [263]. Może to być związane z właściwościami limfocytów Th17 określanymi jako przypominające cechy komórek macierzystych (ang. „stemness”) oraz ich zdolnością do długotrwałego przeżycia przy zachowaniu fenotypu efektorowego [264]. Istotne jest również, że modulacja różnych szlaków sygnałowych może prowadzić

do przeprogramowania metabolizmu limfocytów i zmian w funkcjonowaniu mitochondriów [265]. Rola szlaku Wnt/ β -katenina w regulacji metabolizmu limfocytów T pozostaje jednak nieznana. Wiadomo jedynie, że nadmierna aktywacja tego szlaku w komórkach glejaka powoduje zmiany metabolizmu, nasilając proces glikolizy [266]. Zgodne z tym są obserwacje dotyczące psich limfocytów traktowanych TWS119, które charakteryzowały się obniżoną wartością OCR w porównaniu z komórkami różnicowanymi w obecności indometacyny. Może to sugerować zwiększone wykorzystanie glikolizy w limfocytach T z aktywowanym szlakiem sygnałowym Wnt/ β -katenina. Podsumowując, różne subpopulacje limfocytów T wykazują zróżnicowane strategie metaboliczne, nawet w obrębie klasycznie zdefiniowanych populacji [267]. Wyniki naszych badań sugerują, że modulacja szlaków sygnałowych, takich jak Wnt/ β -katenina, może powodować zmiany w sposobie wytwarzania i wykorzystania energii przez limfocyty Th17, co może mieć znaczenie dla ich funkcji i przeżywalności w warunkach *in vitro*.

6. Podsumowanie

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej pozwoliły na opracowanie i zoptymalizowanie warunków aktywacji, namnażania oraz różnicowania psich limfocytów T w warunkach *in vitro*. Wykazano, że zastosowanie mikrokulek magnetycznych MicroBeads pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28 skutecznie indukuje aktywację psich PBL. W przypadku gdy w hodowli znajdowała się wyłącznie subpopulacja limfocytów T CD4⁺, skuteczniejszy okazał się inny rodzaj mikrokulek magnetycznych – EpoxyBeads. Przedstawione wyniki badań sugerują, że zastosowanie obu rodzajów mikrokulek magnetycznych nasila proliferację oraz różnicowanie limfocytów T, przewyższając pod tym względem dotychczas stosowane metody stymulacji, takie jak ConA, a także stanowiąc alternatywę dla komórek K562. Co istotne, wydajność metody aktywacji zależy od rodzaju komórek znajdujących się w hodowli *in vitro*.

Optymalizacja stosunku liczby komórek do mikrokulek MicroBeads pozwoliła ograniczyć apoptozę limfocytów oraz zapewnić ich skuteczne namnażanie przy zachowaniu wysokiej żywotności. Badania potwierdziły, że psie limfocyty T reagują na różną siłę sygnału aktywującego w sposób zbliżony do komórek ludzkich, co nadaje uzyskanym wynikom istotne znaczenie w kontekście medycyny translacyjnej. Wykazano również, że temperatura inkubacji wpływa na skuteczność aktywacji – najwyższą wydajność osiągnięto w temperaturze 37-38,5°C. Ponadto stwierdzono, że aktywacja limfocytów T z użyciem mikrokulek magnetycznych MicroBeads nie nasiliła AICD, w przeciwieństwie do stymulacji z użyciem ConA. Limfocyty T aktywowane mikrokulkami magnetycznymi MicroBeads charakteryzowały się wysoką zdolnością do proliferacji, nabywały fenotyp pamięci efektorowej i wytwarzały istotne ilości cytokin prozapalnych, w tym IFN- γ , co potwierdza ich funkcjonalność.

Przedstawione badania pozwoliły także na opracowanie metody różnicowania psich limfocytów Th17 w warunkach *in vitro* oraz scharakteryzowanie związanych z tym procesem zmian fenotypowych i metabolicznych. Jest to pierwsze badanie, w którym wykazano, że połączenie metody aktywacji psich limfocytów T CD4⁺, opartej na równoczesnym zaangażowaniu cząsteczki CD3 i cząsteczki kostymulującej CD28, z hodowlą w odpowiedniej pożywce różnicującej umożliwia uzyskanie wysokiego odsetka limfocytów Th17. Dodatkowo przeanalizowano potencjalne zastosowanie modulatorów szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina w celu zwiększenia wydajności

procesu różnicowania. Zastosowanie indometacyny, która oddziałuje na wiele szlaków sygnałowych, w tym hamując na aktywność szlaku Wnt/ β -katenina, doprowadziło do znaczącego wzrostu odsetka limfocytów T CD4⁺ wytwarzających IL-17. Analiza fenotypu pamięci wykazała, że limfocyty T CD4⁺ różnicowane w kierunku Th17 z zastosowaniem pożywki różnicującej, a także z dodatkiem indometacyny lub XAV939 charakteryzowały się fenotypem limfocytów T_{EM}. Ponadto ocena aktywności mitochondrialnej wykazała, że komórki różnicowane w obecności indometacyny charakteryzują się najbardziej wydajną fosforylacją oksydacyjną. Zastosowanie TWS119, aktywatora szlaku Wnt/ β -katenina, hamowało różnicowanie limfocytów Th17, co przejawiało się istotnie niższym odsetkiem komórek produkujących IL-17 i wykazujących ekspresję czynnika transkrypcyjnego ROR γ t. W tym przypadku obserwowano zwiększenie odsetka limfocytów T_{CM}, a także obniżenie poziomu oddychania mitochondrialnego. Działanie TWS119 ograniczające różnicowanie limfocytów Th17 potwierdza, że szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina uczestniczy w regulacji tego procesu.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że modulatory szlaku Wnt/ β -katenina mogą wpływać na fenotyp oraz aktywność metaboliczną limfocytów Th17. W pracy wykazano, że indometacyna wspiera różnicowanie psich limfocytów T CD4⁺ w kierunku fenotypu Th17. Choć konieczne jest dalsze poznanie mechanizmów regulujących ten proces, uzyskane obserwacje mogą stanowić podstawę do przyszłych badań nad zastosowaniem indometacyny jako czynnika wspierającego różnicowanie limfocytów Th17. Taki kierunek badań wydaje się szczególnie interesujący w kontekście charakterystycznych właściwości komórek Th17 i ich zastosowania w immunoterapii.

Przedstawiona w niniejszej pracy doktorskiej metoda aktywacji i ekspansji psich limfocytów izolowanych z krwi obwodowej umożliwia precyzyjną kontrolę siły sygnału aktywującego oraz mechanizmów kostymulacji, co przekłada się na wydajną proliferację i uzyskanie wysoce funkcjonalnych komórek. W trakcie badań nad różnicowaniem uzyskano najwyższy odsetek psich limfocytów Th17 opisany w dotychczasowej literaturze, co podkreśla potencjał opracowanych metod. Uzyskane wyniki nie tylko poszerzają wiedzę na temat biologii psich limfocytów, ale również mogą przyczynić się do rozwoju adoptywnej immunoterapii w medycynie weterynaryjnej.

7. Wnioski

Realizacja zaplanowanych celów badawczych pozwoliła na weryfikację postawionych hipotez oraz sformułowanie następujących wniosków:

- 1) Zastosowanie mikrokulek magnetycznych pokrytych przeciwciałami skierowanymi przeciwko cząsteczkom CD3 i CD28 skutecznie indukuje aktywację psich limfocytów T w warunkach *in vitro*, a efektywność metody aktywacji zależy od rodzaju komórek znajdujących się w hodowli *in vitro*.
- 2) Limfocyty Th wyizolowane z krwi obwodowej psów można skutecznie różnicować do fenotypu komórek Th17, stosując opracowany protokół oparty na aktywacji limfocytów T CD4⁺ z zastosowaniem mikrokulek magnetycznych EpoxyBeads oraz hodowli w odpowiedniej pożywce różnicującej.
- 3) Modulacja szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina wpływa na proces różnicowania limfocytów Th17. Zahamowanie szlaku Wnt/ β -katenina poprzez zastosowanie indometacyny wspiera różnicowanie limfocytów Th17, podczas gdy użycie aktywatora tego szlaku, TWS119, hamuje ten proces.
- 4) Opracowane w rozprawie doktorskiej metody aktywacji psich limfocytów izolowanych z krwi obwodowej oraz limfocytów Th umożliwiają uzyskanie komórek charakteryzujących się zdolnością do proliferacji, wysoką żywotnością oraz funkcjonalnością.

8. Bibliografia

1. Chaplin, D.D. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol* **2010**, *125*, S3-23, doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.
2. Morath, A.; Schamel, W.W. A β and $\Gamma\delta$ T Cell Receptors: Similar but Different. *J Leukoc Biol* **2020**, *107*, 1045–1055, doi:10.1002/JLB.2MR1219-233R.
3. Smith-Garvin, J.E.; Koretzky, G.A.; Jordan, M.S. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol* **2009**, *27*, 591–619, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706.
4. Mariuzza, R.A.; Agnihotri, P.; Orban, J. The Structural Basis of T-Cell Receptor (TCR) Activation: An Enduring Enigma. *J Biol Chem* **2020**, *295*, 914–925, doi:10.1074/jbc.REV119.009411.
5. Chen, L.; Flies, D.B. Molecular Mechanisms of T Cell Co-Stimulation Co-Inhibition. *Nat Rev Immunol* **2013**, *13*, 227–242, doi:10.1038/nri3405.
6. Hu, Y.; Hu, Q.; Li, Y.; Lu, L.; Xiang, Z.; Yin, Z.; Kabelitz, D.; Wu, Y. $\Gamma\delta$ T Cells: Origin and Fate, Subsets, Diseases and Immunotherapy. *Sig Transduct Target Ther* **2023**, *8*, 434, doi:10.1038/s41392-023-01653-8.
7. Ollila, J.; Vihinen, M. B Cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2005**, *37*, 518–523, doi:10.1016/j.biocel.2004.09.007.
8. Yam-Puc, J.C.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Toellner, K.-M. Role of B-Cell Receptors for B-Cell Development and Antigen-Induced Differentiation. *F1000Res* **2018**, *7*, 429, doi:10.12688/f1000research.13567.1.
9. Charles A Janeway, J.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. B-Cell Activation by Armed Helper T Cells. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*; Garland Science, 2001.
10. Eiz-Vesper, B.; Schmetzer, H.M. Antigen-Presenting Cells: Potential of Proven Und New Players in Immune Therapies. *Transfus Med Hemother* **2020**, *47*, 429–431, doi:10.1159/000512729.
11. Lim, T.S.; Goh, J.K.H.; Mortellaro, A.; Lim, C.T.; Hämmerling, G.J.; Ricciardi-Castagnoli, P. CD80 and CD86 Differentially Regulate Mechanical Interactions of T-Cells with Antigen-Presenting Dendritic Cells and B-Cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e45185, doi:10.1371/journal.pone.0045185.
12. Martin, F.; Chan, A.C. Pathogenic Roles of B Cells in Human Autoimmunity; Insights from the Clinic. *Immunity* **2004**, *20*, 517–527, doi:10.1016/s1074-7613(04)00112-8.
13. Crotty, S. A Brief History of T Cell Help to B Cells. *Nat Rev Immunol* **2015**, *15*, 185–189, doi:10.1038/nri3803.
14. Cyster, J.G.; Allen, C.D.C. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell* **2019**, *177*, 524–540, doi:10.1016/j.cell.2019.03.016.
15. Tangye, S.G.; Ferguson, A.; Avery, D.T.; Ma, C.S.; Hodgkin, P.D. Isotype Switching by Human B Cells Is Division-Associated and Regulated by Cytokines. *J Immunol* **2002**, *169*, 4298–4306, doi:10.4049/jimmunol.169.8.4298.
16. Farhood, B.; Najafi, M.; Mortezaee, K. CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Immunotherapy: A Review. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 8509–8521, doi:10.1002/jcp.27782.
17. Andersen, M.H.; Schrama, D.; Straten, P. thor; Becker, J.C. Cytotoxic T Cells. *J Invest Dermatol* **2006**, *126*, 32–41, doi:10.1038/sj.jid.5700001.
18. Zhang, N.; Bevan, M.J. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* **2011**, *35*, 161–168, doi:10.1016/j.immuni.2011.07.010.
19. Rout, P.; Caminero, F.; Iqbal, Z.; Tadi, P. Histology, Cytotoxic T Cells. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2025.

20. Al Moussawy, M.; Abdelsamed, H.A. Non-Cytotoxic Functions of CD8 T Cells: “epentance of a Serial Killer.” *Front Immunol* **2022**, *13*, 1001129, doi:10.3389/fimmu.2022.1001129.
21. Hassin, D.; Garber, O.G.; Meiraz, A.; Schiffenbauer, Y.S.; Berke, G. Cytotoxic T Lymphocyte Perforin and Fas Ligand Working in Concert Even When Fas Ligand Lytic Action Is Still Not Detectable. *Immunology* **2011**, *133*, 190–196, doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03426.x.
22. Waring, P.; Müllbacher, A. Cell Death Induced by the Fas/Fas Ligand Pathway and Its Role in Pathology. *Immunology & Cell Biology* **1999**, *77*, 312–317, doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x.
23. Sonar, S.; Lal, G. Role of Tumor Necrosis Factor Superfamily in Neuroinflammation and Autoimmunity. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, doi:10.3389/fimmu.2015.00364.
24. Rossin, A.; Miloro, G.; Hueber, A.-O. TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 639, doi:10.3390/cancers11050639.
25. Alim, L.F.; Keane, C.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F. Molecular Mechanisms of Tumour Necrosis Factor Signalling via TNF Receptor 1 and TNF Receptor 2 in the Tumour Microenvironment. *Current Opinion in Immunology* **2024**, *86*, 102409, doi:10.1016/j.coi.2023.102409.
26. Preedy, M.K.; White, M.R.H.; Tergaonkar, V. Cellular Heterogeneity in TNF/TNFR1 Signalling: Live Cell Imaging of Cell Fate Decisions in Single Cells. *Cell Death Dis* **2024**, *15*, 202, doi:10.1038/s41419-024-06559-z.
27. Herbert, J.A.; Panagiotou, S. Immune Response to Viruses. In *Encyclopedia of Infection and Immunity*; Rezaei, N., Ed.; Elsevier: Oxford, 2022; pp. 429–444 ISBN 978-0-323-90303-5.
28. Kaech, S.M.; Cui, W. Transcriptional Control of Effector and Memory CD8⁺ T Cell Differentiation. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12*, 749–761, doi:10.1038/nri3307.
29. Verdon, D.J.; Mulazzani, M.; Jenkins, M.R. Cellular and Molecular Mechanisms of CD8⁺ T Cell Differentiation, Dysfunction and Exhaustion. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 7357, doi:10.3390/ijms21197357.
30. Schoenborn, J.R.; Wilson, C.B. Regulation of Interferon-Gamma during Innate and Adaptive Immune Responses. *Adv Immunol* **2007**, *96*, 41–101, doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2.
31. Jorgovanovic, D.; Song, M.; Wang, L.; Zhang, Y. Roles of IFN- γ in Tumor Progression and Regression: A Review. *Biomark Res* **2020**, *8*, 49, doi:10.1186/s40364-020-00228-x.
32. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. T Cells and MHC Proteins. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*; Garland Science, 2002.
33. Jaczewska, J.; Abdulreda, M.H.; Yau, C.Y.; Schmitt, M.M.; Schubert, I.; Berggren, P.-O.; Weber, C.; Koenen, R.R.; Moy, V.T.; Wojcikiewicz, E.P. TNF- α and IFN- γ Promote Lymphocyte Adhesion to Endothelial Junctional Regions Facilitating Transendothelial Migration. *J Leukoc Biol* **2014**, *95*, 265–274, doi:10.1189/jlb.0412205.
34. Griffin, G.K.; Newton, G.; Tarrio, M.L.; Bu, D.; Maganto-Garcia, E.; Azcutia, V.; Alcaide, P.; Grabie, N.; Luscinskas, F.W.; Croce, K.J.; et al. IL-17 and TNF- α Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. *J Immunol* **2012**, *188*, 6287–6299, doi:10.4049/jimmunol.1200385.

35. Matsuo, K.; Yoshie, O.; Nakayama, T. Multifaceted Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Tumor Immunity. *Cancers (Basel)* **2021**, *13*, 6132, doi:10.3390/cancers13236132.
36. Shouse, A.N.; LaPorte, K.M.; Malek, T.R. IL-2 Signaling Strength Dictates T Cell Biology and Therapeutic Outcomes in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* **2024**, *57*, 414–428, doi:10.1016/j.immuni.2024.02.001.
37. Toumi, R.; Yuzefpolskiy, Y.; Vegaraju, A.; Xiao, H.; Smith, K.A.; Sarkar, S.; Kalia, V. Autocrine and Paracrine IL-2 Signals Collaborate to Regulate Distinct Phases of CD8 T Cell Memory. *Cell Rep* **2022**, *39*, 110632, doi:10.1016/j.celrep.2022.110632.
38. Kan, A.K.C.; Tang, W.T.; Li, P.H. Helper T Cell Subsets: Development, Function and Clinical Role in Hypersensitivity Reactions in the Modern Perspective. *Heliyon* **2024**, *10*, e30553, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e30553.
39. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Helper T Cells and Lymphocyte Activation. In *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition; Garland Science, 2002.
40. Dong, C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annual Review of Immunology* **2021**, *39*, 51–76, doi:10.1146/annurev-immunol-061020-053702.
41. Schmitt, N.; Ueno, H. Regulation of Human Helper T Cell Subset Differentiation by Cytokines. *Current Opinion in Immunology* **2015**, *34*, 130–136, doi:10.1016/j.coi.2015.03.007.
42. Luckheeram, R.V.; Zhou, R.; Verma, A.D.; Xia, B. CD4⁺T Cells: Differentiation and Functions. *Clin Dev Immunol* **2012**, *2012*, 925135, doi:10.1155/2012/925135.
43. Becskei, A.; Grusby, M.J. Contribution of IL-12R Mediated Feedback Loop to Th1 Cell Differentiation. *FEBS Letters* **2007**, *581*, 5199–5206, doi:10.1016/j.febslet.2007.10.007.
44. Szabo, S.J.; Kim, S.T.; Costa, G.L.; Zhang, X.; Fathman, C.G.; Glimcher, L.H. A Novel Transcription Factor, T-Bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell* **2000**, *100*, 655–669, doi:10.1016/s0092-8674(00)80702-3.
45. Zhuang, Y.; Huang, Z.; Nishida, J.; Brown, M.; Zhang, L.; Huang, H. A Continuous T-Bet Expression Is Required to Silence the Interleukin-4-Producing Potential in T Helper Type 1 Cells. *Immunology* **2009**, *128*, 34–42, doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03049.x.
46. Kanhere, A.; Hertweck, A.; Bhatia, U.; Gökmen, M.R.; Perucha, E.; Jackson, I.; Lord, G.M.; Jenner, R.G. T-Bet and GATA3 Orchestrate Th1 and Th2 Differentiation through Lineage-Specific Targeting of Distal Regulatory Elements. *Nat Commun* **2012**, *3*, 1268, doi:10.1038/ncomms2260.
47. Lazarevic, V.; Chen, X.; Shim, J.-H.; Hwang, E.-S.; Jang, E.; Bolm, A.N.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K.; Glimcher, L.H. Transcription Factor T-Bet Represses TH17 Differentiation by Preventing Runx1-Mediated Activation of the RORγt Gene. *Nat Immunol* **2011**, *12*, 96–104, doi:10.1038/ni.1969.
48. Charles A Janeway, J.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. Macrophage Activation by Armed CD4 TH1 Cells. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition; Garland Science, 2001.
49. Deo, S.S.; Mistry, K.J.; Kakade, A.M.; Niphadkar, P.V. Role Played by Th2 Type Cytokines in IgE Mediated Allergy and Asthma. *Lung India* **2010**, *27*, 66–71, doi:10.4103/0970-2113.63609.
50. Ogulur, I.; Mitamura, Y.; Yazici, D.; Pat, Y.; Ardicli, S.; Li, M.; D'Avino, P.; Beha, C.; Babayev, H.; Zhao, B.; et al. Type 2 Immunity in Allergic Diseases. *Cell Mol Immunol* **2025**, *22*, 211–242, doi:10.1038/s41423-025-01261-2.

51. Chen, J.; Guan, L.; Tang, L.; Liu, S.; Zhou, Y.; Chen, C.; He, Z.; Xu, L. T Helper 9 Cells: A New Player in Immune-Related Diseases. *DNA Cell Biol* **2019**, *38*, 1040–1047, doi:10.1089/dna.2019.4729.
52. Schmitt, E.; Klein, M.; Bopp, T. Th9 Cells, New Players in Adaptive Immunity. *Trends in Immunology* **2014**, *35*, 61–68, doi:10.1016/j.it.2013.10.004.
53. Ma, C.S.; Tangye, S.G.; Deenick, E.K. Human Th9 Cells: Inflammatory Cytokines Modulate IL-9 Production through the Induction of IL-21. *Immunol Cell Biol* **2010**, *88*, 621–623, doi:10.1038/icb.2010.73.
54. Chen, W.; Xu, Z.; Xu, H.; Ho, S.; Yu, C.; He, R.; Tam, L.-S.; Wei, W.; Tu, J. Th9-Derived IL-9 in Autoimmune Diseases: An Update. *Life Sciences* **2025**, *375*, 123720, doi:10.1016/j.lfs.2025.123720.
55. Jabeen, R.; Kaplan, M.H. The Symphony of the Ninth: The Development and Function of Th9 Cells. *Curr Opin Immunol* **2012**, *24*, 303–307, doi:10.1016/j.coi.2012.02.001.
56. Chen, T.; Guo, J.; Cai, Z.; Li, B.; Sun, L.; Shen, Y.; Wang, S.; Wang, Z.; Wang, Z.; Wang, Y.; et al. Th9 Cell Differentiation and Its Dual Effects in Tumor Development. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.01026.
57. Purwar, R.; Schlapbach, C.; Xiao, S.; Kang, H.S.; Elyaman, W.; Jiang, X.; Jetten, A.M.; Khoury, S.J.; Fuhlbrigge, R.C.; Kuchroo, V.K.; et al. Robust Tumor Immunity to Melanoma Mediated by Interleukin-9–Producing T Cells. *Nat Med* **2012**, *18*, 1248–1253, doi:10.1038/nm.2856.
58. Shen, Y.; Song, Z.; Lu, X.; Ma, Z.; Lu, C.; Zhang, B.; Chen, Y.; Duan, M.; Apetoh, L.; Li, X.; et al. Fas Signaling-Mediated TH9 Cell Differentiation Favors Bowel Inflammation and Antitumor Functions. *Nat Commun* **2019**, *10*, 2924, doi:10.1038/s41467-019-10889-4.
59. You, F.-P.; Zhang, J.; Cui, T.; Zhu, R.; Lv, C.-Q.; Tang, H.-T.; Sun, D.-W. Th9 Cells Promote Antitumor Immunity via IL-9 and IL-21 and Demonstrate Atypical Cytokine Expression in Breast Cancer. *International Immunopharmacology* **2017**, *52*, 163–167, doi:10.1016/j.intimp.2017.08.031.
60. Lu, Y.; Hong, S.; Li, H.; Park, J.; Hong, B.; Wang, L.; Zheng, Y.; Liu, Z.; Xu, J.; He, J.; et al. Th9 Cells Promote Antitumor Immune Responses in Vivo. *J Clin Invest* **2012**, *122*, 4160–4171, doi:10.1172/JCI65459.
61. Trifari, S.; Kaplan, C.D.; Tran, E.H.; Crellin, N.K.; Spits, H. Identification of a Human Helper T Cell Population That Has Abundant Production of Interleukin 22 and Is Distinct from TH-17, TH1 and TH2 Cells. *Nat Immunol* **2009**, *10*, 864–871, doi:10.1038/ni.1770.
62. Jiang, Q.; Yang, G.; Xiao, F.; Xie, J.; Wang, S.; Lu, L.; Cui, D. Role of Th22 Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fimmu.2021.688066.
63. Zhang, K.; Chen, L.; Zhu, C.; Zhang, M.; Liang, C. Current Knowledge of Th22 Cell and IL-22 Functions in Infectious Diseases. *Pathogens* **2023**, *12*, 176, doi:10.3390/pathogens12020176.
64. Pan, Y.; Du, D.; Wang, L.; Wang, X.; He, G.; Jiang, X. The Role of T Helper 22 Cells in Dermatological Disorders. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fimmu.2022.911546.
65. Eyerich, S.; Eyerich, K.; Pennino, D.; Carbone, T.; Nasorri, F.; Pallotta, S.; Cianfarani, F.; Odorisio, T.; Traidl-Hoffmann, C.; Behrendt, H.; et al. Th22 Cells Represent a Distinct Human T Cell Subset Involved in Epidermal Immunity and Remodeling. *J Clin Invest* **2009**, *119*, 3573–3585, doi:10.1172/JCI40202.

66. Eyerich, S.; Eyerich, K.; Pennino, D.; Carbone, T.; Nasorri, F.; Pallotta, S.; Cianfarani, F.; Odorisio, T.; Traidl-Hoffmann, C.; Behrendt, H.; et al. Th22 Cells Represent a Distinct Human T Cell Subset Involved in Epidermal Immunity and Remodeling. *J Clin Invest* **2009**, *119*, 3573–3585, doi:10.1172/JCI40202.
67. Duarte, J.H.; Di Meglio, P.; Hirota, K.; Ahlfors, H.; Stockinger, B. Differential Influences of the Aryl Hydrocarbon Receptor on Th17 Mediated Responses in Vitro and in Vivo. *PLoS One* **2013**, *8*, e79819, doi:10.1371/journal.pone.0079819.
68. Zhang, L.; Li, Y.; Li, Y.; Qi, L.; Liu, X.; Yuan, C.; Hu, N.; Ma, D.; Li, Z.; Yang, Q.; et al. Increased Frequencies of Th22 Cells as Well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e31000, doi:10.1371/journal.pone.0031000.
69. Gittler, J.K.; Shemer, A.; Suárez-Fariñas, M.; Fuentes-Duculan, J.; Gulewicz, K.J.; Wang, C.Q.F.; Mitsui, H.; Cardinale, I.; de Guzman Strong, C.; Krueger, J.G.; et al. Progressive Activation of TH2/TH22 Cytokines and Selective Epidermal Proteins Characterizes Acute and Chronic Atopic Dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2012**, *130*, 1344–1354, doi:10.1016/j.jaci.2012.07.012.
70. Vinuesa, C.G.; Linterman, M.A.; Yu, D.; MacLennan, I.C.M. Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2016**, *34*, 335–368, doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055605.
71. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **2019**, *50*, 1132–1148, doi:10.1016/j.immuni.2019.04.011.
72. Ma, C.S.; Deenick, E.K. Human T Follicular Helper (Tfh) Cells and Disease. *Immunol Cell Biol* **2014**, *92*, 64–71, doi:10.1038/icb.2013.55.
73. Feng, H.; Zhao, Z.; Dong, C. Adapting to the World: The Determination and Plasticity of T Follicular Helper Cells. *J Allergy Clin Immunol* **2022**, *150*, 981–989, doi:10.1016/j.jaci.2022.09.018.
74. Ma, X.; Nakayamada, S. Multi-Source Pathways of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Front Immunol* **2021**, *12*, 621105, doi:10.3389/fimmu.2021.621105.
75. Seth, A.; Craft, J. Spatial and Functional Heterogeneity of Follicular Helper T Cells in Autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* **2019**, *61*, 1–9, doi:10.1016/j.coi.2019.06.005.
76. Park, H.; Li, Z.; Yang, X.O.; Chang, S.H.; Nurieva, R.; Wang, Y.-H.; Wang, Y.; Hood, L.; Zhu, Z.; Tian, Q.; et al. A Distinct Lineage of CD4 T Cells Regulates Tissue Inflammation by Producing Interleukin 17. *Nat Immunol* **2005**, *6*, 1133–1141, doi:10.1038/ni1261.
77. Dong, C. Differentiation and Function of Pro-Inflammatory Th17 Cells. *Microbes Infect* **2009**, *11*, 584–588, doi:10.1016/j.micinf.2009.04.001.
78. Maddur, M.S.; Miossec, P.; Kaveri, S.V.; Bayry, J. Th17 Cells. *The American Journal of Pathology* **2012**, *181*, 8–18, doi:10.1016/j.ajpath.2012.03.044.
79. Zambrano-Zaragoza, J.F.; Romo-Martínez, E.J.; Durán-Avelar, Ma.D.J.; García-Magallanes, N.; Vibanco-Pérez, N. Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases. *International Journal of Inflammation* **2014**, *2014*, 1–12, doi:10.1155/2014/651503.
80. Veldhoen, M.; Hocking, R.J.; Atkins, C.J.; Locksley, R.M.; Stockinger, B. TGFbeta in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports de Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* **2006**, *24*, 179–189, doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001.
81. Alizadeh, D.; Katsanis, E.; Larmonier, N. The Multifaceted Role of Th17 Lymphocytes and Their Associated Cytokines in Cancer. *Clin Dev Immunol* **2013**, *2013*, 957878, doi:10.1155/2013/957878.

82. Yang, L.; Anderson, D.E.; Baecher-Allan, C.; Hastings, W.D.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K.; Hafler, D.A. IL-21 and TGF- β Are Required for Differentiation of Human T(H)17 Cells. *Nature* **2008**, *454*, 350–352, doi:10.1038/nature07021.
83. Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **2009**, *27*, 485–517, doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
84. McGeachy, M.J.; Chen, Y.; Tato, C.M.; Laurence, A.; Joyce-Shaikh, B.; Blumenschein, W.M.; McClanahan, T.K.; O'Shea, J.J.; Cua, D.J. The Interleukin 23 Receptor Is Essential for the Terminal Differentiation of Interleukin 17–Producing Effector T Helper Cells in Vivo. *Nat Immunol* **2009**, *10*, 314–324, doi:10.1038/ni.1698.
85. Stritesky, G.L.; Yeh, N.; Kaplan, M.H. IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. *J Immunol* **2008**, *181*, 5948–5955, doi:10.4049/jimmunol.181.9.5948.
86. Muranski, P.; Restifo, N.P. Essentials of Th17 Cell Commitment and Plasticity. *Blood* **2013**, *121*, 2402–2414, doi:10.1182/blood-2012-09-378653.
87. Yang, X.O.; Pappu, B.P.; Nurieva, R.; Akimzhanov, A.; Kang, H.S.; Chung, Y.; Ma, L.; Shah, B.; Panopoulos, A.D.; Schluns, K.S.; et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* **2008**, *28*, 29–39, doi:10.1016/j.immuni.2007.11.016.
88. Ciofani, M.; Madar, A.; Galan, C.; Sellars, M.; Mace, K.; Pauli, F.; Agarwal, A.; Huang, W.; Parkurst, C.N.; Muratet, M.; et al. A Validated Regulatory Network for Th17 Cell Specification. *Cell* **2012**, *151*, 289–303, doi:10.1016/j.cell.2012.09.016.
89. Brüstle, A.; Heink, S.; Huber, M.; Rosenplänter, C.; Stadelmann, C.; Yu, P.; Arpaia, E.; Mak, T.W.; Kamradt, T.; Lohoff, M. The Development of Inflammatory TH-17 Cells Requires Interferon-Regulatory Factor 4. *Nat Immunol* **2007**, *8*, 958–966, doi:10.1038/ni1500.
90. Chen, Q.; Yang, W.; Gupta, S.; Biswas, P.; Smith, P.; Bhagat, G.; Pernis, A.B. IRF-4-Binding Protein Inhibits Interleukin-17 and Interleukin-21 Production by Controlling the Activity of IRF-4 Transcription Factor. *Immunity* **2008**, *29*, 899–911, doi:10.1016/j.immuni.2008.10.011.
91. McAleer, J.P.; Kolls, J.K. Mechanisms Controlling Th17 Cytokine Expression and Host Defense. *Journal of Leukocyte Biology* **2011**, *90*, 263–270, doi:10.1189/jlb.0211099.
92. Santarlasci, V.; Maggi, L.; Capone, M.; Frosali, F.; Querci, V.; De Palma, R.; Liotta, F.; Cosmi, L.; Maggi, E.; Romagnani, S.; et al. TGF- β Indirectly Favors the Development of Human Th17 Cells by Inhibiting Th1 Cells. *European Journal of Immunology* **2009**, *39*, 207–215, doi:10.1002/eji.200838748.
93. Das, J.; Ren, G.; Zhang, L.; Roberts, A.I.; Zhao, X.; Bothwell, A.L.M.; Van Kaer, L.; Shi, Y.; Das, G. Transforming Growth Factor β Is Dispensable for the Molecular Orchestration of Th17 Cell Differentiation. *Journal of Experimental Medicine* **2009**, *206*, 2407–2416, doi:10.1084/jem.20082286.
94. Akimzhanov, A.M.; Yang, X.O.; Dong, C. Chromatin Remodeling of Interleukin-17 (IL-17)-IL-17F Cytokine Gene Locus during Inflammatory Helper T Cell Differentiation *. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 5969–5972, doi:10.1074/jbc.C600322200.
95. Ouyang, W.; Kolls, J.K.; Zheng, Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* **2008**, *28*, 454–467, doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004.

96. Marques, H.S.; de Brito, B.B.; da Silva, F.A.F.; Santos, M.L.C.; de Souza, J.C.B.; Correia, T.M.L.; Lopes, L.W.; Neres, N.S. de M.; Dórea, R.S.D.M.; Dantas, A.C.S.; et al. Relationship between Th17 Immune Response and Cancer. *World J Clin Oncol* **2021**, *12*, 845–867, doi:10.5306/wjco.v12.i10.845.
97. Khader, S.A.; Gaffen, S.L.; Kolls, J.K. Th17 Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity against Infectious Diseases at the Mucosa. *Mucosal Immunol* **2009**, *2*, 403–411, doi:10.1038/mi.2009.100.
98. Chen, K.; McAleer, J.P.; Lin, Y.; Paterson, D.L.; Zheng, M.; Alcorn, J.F.; Weaver, C.T.; Kolls, J.K. Th17 Cells Mediate Clade-Specific, Serotype-Independent Mucosal Immunity. *Immunity* **2011**, *35*, 997–1009, doi:10.1016/j.immuni.2011.10.018.
99. Bacher, P.; Hohnstein, T.; Beerbaum, E.; Röcker, M.; Blango, M.G.; Kaufmann, S.; Röhm, J.; Eschenhagen, P.; Grehn, C.; Seidel, K.; et al. Human Anti-Fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida Albicans*. *Cell* **2019**, *176*, 1340–1355.e15, doi:10.1016/j.cell.2019.01.041.
100. Ohara, D.; Takeuchi, Y.; Hirota, K. Type 17 Immunity: Novel Insights into Intestinal Homeostasis and Autoimmune Pathogenesis Driven by Gut-Primed T Cells. *Cell Mol Immunol* **2024**, *21*, 1183–1200, doi:10.1038/s41423-024-01218-x.
101. Knochelmann, H.M.; Dwyer, C.J.; Bailey, S.R.; Amaya, S.M.; Elston, D.M.; Mazza-McCrann, J.M.; Paulos, C.M. When Worlds Collide: Th17 and Treg Cells in Cancer and Autoimmunity. *Cell Mol Immunol* **2018**, *15*, 458–469, doi:10.1038/s41423-018-0004-4.
102. Arshad, T.; Mansur, F.; Palek, R.; Manzoor, S.; Liska, V. A Double Edged Sword Role of Interleukin-22 in Wound Healing and Tissue Regeneration. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.02148.
103. Liang, S.C.; Tan, X.-Y.; Luxenberg, D.P.; Karim, R.; Dunussi-Joannopoulos, K.; Collins, M.; Fouser, L.A. Interleukin (IL)-22 and IL-17 Are Coexpressed by Th17 Cells and Cooperatively Enhance Expression of Antimicrobial Peptides. *J Exp Med* **2006**, *203*, 2271–2279, doi:10.1084/jem.20061308.
104. Aujla, S.J.; Chan, Y.R.; Zheng, M.; Fei, M.; Askew, D.J.; Pociask, D.A.; Reinhart, T.A.; McAllister, F.; Edeal, J.; Gaus, K.; et al. IL-22 Mediates Mucosal Host Defense against Gram-Negative Bacterial Pneumonia. *Nat Med* **2008**, *14*, 275–281, doi:10.1038/nm1710.
105. Keir, M.E.; Yi, T.; Lu, T.T.; Ghilardi, N. The Role of IL-22 in Intestinal Health and Disease. *Journal of Experimental Medicine* **2020**, *217*, e20192195, doi:10.1084/jem.20192195.
106. Blaschitz, C.; Raffatellu, M. Th17 Cytokines and the Gut Mucosal Barrier. *J Clin Immunol* **2010**, *30*, 196–203, doi:10.1007/s10875-010-9368-7.
107. Wu, X.; Tian, J.; Wang, S. Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* **2018**, *9*, 1112, doi:10.3389/fimmu.2018.01112.
108. Omenetti, S.; Bussi, C.; Metidji, A.; Iseppon, A.; Lee, S.; Tolaini, M.; Li, Y.; Kelly, G.; Chakravarty, P.; Shoaie, S.; et al. The Intestine Harbors Functionally Distinct Homeostatic Tissue-Resident and Inflammatory Th17 Cells. *Immunity* **2019**, *51*, 77–89.e6, doi:10.1016/j.immuni.2019.05.004.
109. Stockinger, B.; Omenetti, S. The Dichotomous Nature of T Helper 17 Cells. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17*, 535–544, doi:10.1038/nri.2017.50.
110. Ghoreschi, K.; Laurence, A.; Yang, X.-P.; Tato, C.M.; McGeachy, M.J.; Konkel, J.E.; Ramos, H.L.; Wei, L.; Davidson, T.S.; Bouladoux, N.; et al. Generation of Pathogenic TH17 Cells in the Absence of TGF- β Signalling. *Nature* **2010**, *467*, 967–971, doi:10.1038/nature09447.

111. Yasuda, K.; Takeuchi, Y.; Hirota, K. The Pathogenicity of Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Semin Immunopathol* **2019**, *41*, 283–297, doi:10.1007/s00281-019-00733-8.
112. Shiomi, A.; Usui, T.; Mimori, T. GM-CSF as a Therapeutic Target in Autoimmune Diseases. *Inflammation and Regeneration* **2016**, *36*, 8, doi:10.1186/s41232-016-0014-5.
113. Fan, X.; Shu, P.; Wang, Y.; Ji, N.; Zhang, D. Interactions between Neutrophils and T-Helper 17 Cells. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, doi:10.3389/fimmu.2023.1279837.
114. Moser, T.; Akgün, K.; Proschmann, U.; Sellner, J.; Ziemssen, T. The Role of TH17 Cells in Multiple Sclerosis: Therapeutic Implications. *Autoimmunity Reviews* **2020**, *19*, 102647, doi:10.1016/j.autrev.2020.102647.
115. Lubberts, E. The IL-23–IL-17 Axis in Inflammatory Arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **2015**, *11*, 415–429, doi:10.1038/nrrheum.2015.53.
116. Baumgart, D.C.; Carding, S.R. Inflammatory Bowel Disease: Cause and Immunobiology. *Lancet* **2007**, *369*, 1627–1640, doi:10.1016/S0140-6736(07)60750-8.
117. Martin, J.C.; Baeten, D.L.; Josien, R. Emerging Role of IL-17 and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Clinical Immunology* **2014**, *154*, 1–12, doi:10.1016/j.clim.2014.05.004.
118. Huang, J.; Li, X.; Zhu, Q.; Wang, M.; Xie, Z.; Zhao, T. Imbalance of Th17 Cells, Treg Cells and Associated Cytokines in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1425847, doi:10.3389/fimmu.2024.1425847.
119. Marinoni, B.; Ceribelli, A.; Massarotti, M.S.; Selmi, C. The Th17 Axis in Psoriatic Disease: Pathogenetic and Therapeutic Implications. *Autoimmun Highlights* **2014**, *5*, 9–19, doi:10.1007/s13317-013-0057-4.
120. Newcomb, D.C.; Peebles, R.S. Th17-Mediated Inflammation in Asthma. *Current Opinion in Immunology* **2013**, *25*, 755–760, doi:10.1016/j.coi.2013.08.002.
121. Nurieva, R.; Yang, X.O.; Chung, Y.; Dong, C. Cutting Edge: In Vitro Generated Th17 Cells Maintain Their Cytokine Expression Program in Normal but Not Lymphopenic Hosts¹. *The Journal of Immunology* **2009**, *182*, 2565–2568, doi:10.4049/jimmunol.0803931.
122. Choi, G.; Park, Y.-J.; Cho, M.; Moon, H.; Kim, D.; Kang, C.-Y.; Chung, Y.; Kim, B.-S. A Critical Role for Th17 Cell-Derived TGF-β1 in Regulating the Stability and Pathogenicity of Autoimmune Th17 Cells. *Exp Mol Med* **2021**, *53*, 993–1004, doi:10.1038/s12276-021-00632-9.
123. Hirota, K.; Turner, J.-E.; Villa, M.; Duarte, J.H.; Demengeot, J.; Steinmetz, O.M.; Stockinger, B. Plasticity of TH17 Cells in Peyer's Patches Is Responsible for the Induction of T Cell-Dependent IgA Responses. *Nat Immunol* **2013**, *14*, 372–379, doi:10.1038/ni.2552.
124. Obermayer, N.; Popp, F.C.; Soeder, Y.; Haarer, J.; Geissler, E.K.; Schlitt, H.J.; Dahlke, M.H. Conversion of Th17 into IL-17A(Neg) Regulatory T Cells: A Novel Mechanism in Prolonged Allograft Survival Promoted by Mesenchymal Stem Cell-Supported Minimized Immunosuppressive Therapy. *J Immunol* **2014**, *193*, 4988–4999, doi:10.4049/jimmunol.1401776.
125. Kamali, A.N.; Noorbakhsh, S.M.; Hamedifar, H.; Jadidi-Niaragh, F.; Yazdani, R.; Bautista, J.M.; Azizi, G. A Role for Th1-like Th17 Cells in the Pathogenesis of Inflammatory and Autoimmune Disorders. *Molecular Immunology* **2019**, *105*, 107–115, doi:10.1016/j.molimm.2018.11.015.

126. Leung, S.; Liu, X.; Fang, L.; Chen, X.; Guo, T.; Zhang, J. The Cytokine Milieu in the Interplay of Pathogenic Th1/Th17 Cells and Regulatory T Cells in Autoimmune Disease. *Cell Mol Immunol* **2010**, *7*, 182–189, doi:10.1038/cmi.2010.22.
127. Lee, Y.K.; Mukasa, R.; Hatton, R.D.; Weaver, C.T. Developmental Plasticity of Th17 and Treg Cells. *Curr Opin Immunol* **2009**, *21*, 274–280, doi:10.1016/j.coi.2009.05.021.
128. Brucklacher-Waldert, V.; Stuermer, K.; Kolster, M.; Wolthausen, J.; Tolosa, E. Phenotypical and Functional Characterization of T Helper 17 Cells in Multiple Sclerosis. *Brain* **2009**, *132*, 3329–3341, doi:10.1093/brain/awp289.
129. Kebir, H.; Ifergan, I.; Alvarez, J.I.; Bernard, M.; Poirier, J.; Arbour, N.; Duquette, P.; Prat, A. Preferential Recruitment of Interferon-Gamma-Expressing TH17 Cells in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* **2009**, *66*, 390–402, doi:10.1002/ana.21748.
130. Annunziato, F.; Cosmi, L.; Liotta, F.; Maggi, E.; Romagnani, S. Type 17 T Helper Cells-Origins, Features and Possible Roles in Rheumatic Disease. *Nat Rev Rheumatol* **2009**, *5*, 325–331, doi:10.1038/nrrheum.2009.80.
131. Nistala, K.; Adams, S.; Cambrook, H.; Ursu, S.; Olivito, B.; de Jager, W.; Evans, J.G.; Cimaz, R.; Bajaj-Elliott, M.; Wedderburn, L.R. Th17 Plasticity in Human Autoimmune Arthritis Is Driven by the Inflammatory Environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 14751–14756, doi:10.1073/pnas.1003852107.
132. Toghi, M.; Bitarafan, S.; Ghafouri-Fard, S. Pathogenic Th17 Cells in Autoimmunity with Regard to Rheumatoid Arthritis. *Pathology - Research and Practice* **2023**, *250*, 154818, doi:10.1016/j.prp.2023.154818.
133. Qian, X.; Chen, H.; Wu, X.; Hu, L.; Huang, Q.; Jin, Y. Interleukin-17 Acts as Double-Edged Sword in Anti-Tumor Immunity and Tumorigenesis. *Cytokine* **2017**, *89*, 34–44, doi:10.1016/j.cyto.2015.09.011.
134. Asadzadeh, Z.; Mohammadi, H.; Safarzadeh, E.; Hemmatzadeh, M.; Mahdian-Shakib, A.; Jadidi-Niaragh, F.; Azizi, G.; Baradaran, B. The Paradox of Th17 Cell Functions in Tumor Immunity. *Cell Immunol* **2017**, *322*, 15–25, doi:10.1016/j.cellimm.2017.10.015.
135. Bailey, S.R.; Nelson, M.H.; Himes, R.A.; Li, Z.; Mehrotra, S.; Paulos, C.M. Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, doi:10.3389/fimmu.2014.00276.
136. Chen, C.; Gao, F.-H. Th17 Cells Paradoxical Roles in Melanoma and Potential Application in Immunotherapy. *Front Immunol* **2019**, *10*, 187, doi:10.3389/fimmu.2019.00187.
137. Muranski, P.; Boni, A.; Antony, P.A.; Cassard, L.; Irvine, K.R.; Kaiser, A.; Paulos, C.M.; Palmer, D.C.; Touloukian, C.E.; Ptak, K.; et al. Tumor-Specific Th17-Polarized Cells Eradicate Large Established Melanoma. *Blood* **2008**, *112*, 362–373, doi:10.1182/blood-2007-11-120998.
138. Kryczek, I.; Zhao, E.; Liu, Y.; Wang, Y.; Vatan, L.; Szeliga, W.; Moyer, J.; Klimczak, A.; Lange, A.; Zou, W. Human TH17 Cells Are Long-Lived Effector Memory Cells. *Sci Transl Med* **2011**, *3*, 104ra100, doi:10.1126/scitranslmed.3002949.
139. Muranski, P.; Borman, Z.A.; Kerkar, S.P.; Klebanoff, C.A.; Ji, Y.; Sanchez-Perez, L.; Sukumar, M.; Reger, R.N.; Yu, Z.; Kern, S.J.; et al. Th17 Cells Are Long Lived and Retain a Stem Cell-like Molecular Signature. *Immunity* **2011**, *35*, 972–985, doi:10.1016/j.immuni.2011.09.019.
140. Bowers, J.S.; Nelson, M.H.; Majchrzak, K.; Bailey, S.R.; Rohrer, B.; Kaiser, A.D.; Atkinson, C.; Gattinoni, L.; Paulos, C.M. Th17 Cells Are Refractory to Senescence

- and Retain Robust Antitumor Activity after Long-Term Ex Vivo Expansion. *JCI Insight* **2017**, 2, e90772, doi:10.1172/jci.insight.90772.
141. Majchrzak, K.; Nelson, M.H.; Bailey, S.R.; Bowers, J.S.; Yu, X.-Z.; Rubinstein, M.P.; Himes, R.A.; Paulos, C.M. Exploiting IL-17-Producing CD4⁺ and CD8⁺ T Cells to Improve Cancer Immunotherapy in the Clinic. *Cancer Immunol Immunother* **2016**, 65, 247–259, doi:10.1007/s00262-016-1797-6.
 142. Lei, X.; Xiao, R.; Chen, Z.; Ren, J.; Zhao, W.; Tang, W.; Wen, K.; Zhu, Y.; Li, X.; Ouyang, S.; et al. Augmenting Antitumor Efficacy of Th17-Derived Th1 Cells through IFN- γ -Induced Type I Interferon Response Network via IRF7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2024**, 121, e2412120121, doi:10.1073/pnas.2412120121.
 143. Pan, Y.; Yang, W.; Tang, B.; Wang, X.; Zhang, Q.; Li, W.; Li, L. The Protective and Pathogenic Role of Th17 Cell Plasticity and Function in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* **2023**, 14, 1192303, doi:10.3389/fimmu.2023.1192303.
 144. Zou, D.; Li, X.C.; Chen, W. Beyond T-Cell Subsets: Stemness and Adaptation Redefining Immunity and Immunotherapy. *Cell Mol Immunol* **2025**, 1–18, doi:10.1038/s41423-025-01321-7.
 145. Ozulumba, T.; Montalbino, A.N.; Ortiz-Cárdenas, J.E.; Pompano, R.R. New Tools for Immunologists: Models of Lymph Node Function from Cells to Tissues. *Front Immunol* **2023**, 14, doi:10.3389/fimmu.2023.1183286.
 146. Sun, L.; Su, Y.; Jiao, A.; Wang, X.; Zhang, B. T Cells in Health and Disease. *Signal Transduct Target Ther* **2023**, 8, 235, doi:10.1038/s41392-023-01471-y.
 147. Martínez-Méndez, D.; Mendoza, L.; Villarreal, C.; Huerta, L. Continuous Modeling of T CD4 Lymphocyte Activation and Function. *Front Immunol* **2021**, 12, doi:10.3389/fimmu.2021.743559.
 148. Fooksman, D.R.; Vardhana, S.; Vasiliver-Shamis, G.; Liese, J.; Blair, D.A.; Waite, J.; Sacristán, C.; Vitoria, G.D.; Zanin-Zhorov, A.; Dustin, M.L. Functional Anatomy of T Cell Activation and Synapse Formation. *Annual Review of Immunology* **2010**, 28, 79–105, doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101308.
 149. Courtney, A.H.; Lo, W.-L.; Weiss, A. TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends Biochem Sci* **2018**, 43, 108–123, doi:10.1016/j.tibs.2017.11.008.
 150. Onnis, A.; Baldari, C.T. Orchestration of Immunological Synapse Assembly by Vesicular Trafficking. *Front Cell Dev Biol* **2019**, 7, doi:10.3389/fcell.2019.00110.
 151. Chandler, N.J.; Call, M.J.; Call, M.E. T Cell Activation Machinery: Form and Function in Natural and Engineered Immune Receptors. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, 21, 7424, doi:10.3390/ijms21197424.
 152. Dustin, M.L. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol Res* **2014**, 2, 1023–1033, doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0161.
 153. Rodríguez-Fernández, J.L.; Riolo-Blanco, L.; Delgado-Martín, C. What Is an Immunological Synapse? *Microbes and Infection* **2010**, 12, 438–445, doi:10.1016/j.micinf.2010.03.003.
 154. Love, P.E.; Hayes, S.M. ITAM-Mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, 2, a002485, doi:10.1101/cshperspect.a002485.
 155. Gaud, G.; Lesourne, R.; Love, P.E. Regulatory Mechanisms in T Cell Receptor Signalling. *Nat Rev Immunol* **2018**, 18, 485–497, doi:10.1038/s41577-018-0020-8.

156. Rossy, J.; Williamson, D.J.; Gaus, K. How Does the Kinase Lck Phosphorylate the T Cell Receptor? Spatial Organization as a Regulatory Mechanism. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, doi:10.3389/fimmu.2012.00167.
157. Lo, W.-L.; Shah, N.H.; Ahsan, N.; Horkova, V.; Stepanek, O.; Salomon, A.R.; Kuriyan, J.; Weiss, A. Lck Promotes Zap70-Dependent LAT Phosphorylation by Bridging Zap70 to LAT. *Nat Immunol* **2018**, *19*, 733–741, doi:10.1038/s41590-018-0131-1.
158. Wang, H.; Kadlecsek, T.A.; Au-Yeung, B.B.; Goodfellow, H.E.S.; Hsu, L.-Y.; Freedman, T.S.; Weiss, A. ZAP-70: An Essential Kinase in T-Cell Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a002279, doi:10.1101/cshperspect.a002279.
159. Hwang, J.-R.; Byeon, Y.; Kim, D.; Park, S.-G. Recent Insights of T Cell Receptor-Mediated Signaling Pathways for T Cell Activation and Development. *Exp Mol Med* **2020**, *52*, 750–761, doi:10.1038/s12276-020-0435-8.
160. Boomer, J.S.; Green, J.M. An Enigmatic Tail of CD28 Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a002436, doi:10.1101/cshperspect.a002436.
161. Beyersdorf, N.; Kerkau, T.; Hünig, T. CD28 Co-Stimulation in T-Cell Homeostasis: A Recent Perspective. *Immunotargets Ther* **2015**, *4*, 111–122, doi:10.2147/ITT.S61647.
162. Fraser, J.D.; Irving, B.A.; Crabtree, G.R.; Weiss, A. Regulation of Interleukin-2 Gene Enhancer Activity by the T Cell Accessory Molecule CD28. *Science* **1991**, *251*, 313–316, doi:10.1126/science.1846244.
163. Boise, L.H.; Minn, A.J.; Noel, P.J.; June, C.H.; Accavitti, M.A.; Lindsten, T.; Thompson, C.B. CD28 Costimulation Can Promote T Cell Survival by Enhancing the Expression of Bcl-XL. *Immunity* **1995**, *3*, 87–98, doi:10.1016/1074-7613(95)90161-2.
164. Harding, F.A.; McArthur, J.G.; Gross, J.A.; Raulet, D.H.; Allison, J.P. CD28-Mediated Signalling Co-Stimulates Murine T Cells and Prevents Induction of Anergy in T-Cell Clones. *Nature* **1992**, *356*, 607–609, doi:10.1038/356607a0.
165. Walker, L.S.K.; Sansom, D.M. The Emerging Role of CTLA4 as a Cell-Extrinsic Regulator of T Cell Responses. *Nat Rev Immunol* **2011**, *11*, 852–863, doi:10.1038/nri3108.
166. Alegre, M.-L.; Frauwirth, K.A.; Thompson, C.B. T-Cell Regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* **2001**, *1*, 220–228, doi:10.1038/35105024.
167. Bardhan, K.; Anagnostou, T.; Boussiotis, V.A. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fimmu.2016.00550.
168. Alsaab, H.O.; Sau, S.; Alzhrani, R.; Tatiparti, K.; Bhise, K.; Kashaw, S.K.; Iyer, A.K. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fphar.2017.00561.
169. Bachmann, M.F.; Oxenius, A. Interleukin 2: From Immunostimulation to Immunoregulation and Back Again. *EMBO Rep* **2007**, *8*, 1142–1148, doi:10.1038/sj.embor.7401099.
170. Liao, W.; Lin, J.-X.; Leonard, W.J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity* **2013**, *38*, 13–25, doi:10.1016/j.immuni.2013.01.004.
171. Shouse, A.N.; LaPorte, K.M.; Malek, T.R. Interleukin-2 Signaling in the Regulation of T Cell Biology in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* **2024**, *57*, 414–428, doi:10.1016/j.immuni.2024.02.001.

172. Lan, R.Y.; Selmi, C.; Gershwin, M.E. The Regulatory, Inflammatory, and T Cell Programming Roles of Interleukin-2 (IL-2). *J Autoimmun* **2008**, *31*, 7–12, doi:10.1016/j.jaut.2008.03.002.
173. Ross, S.H.; Cantrell, D.A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **2018**, *36*, 411–433, doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053352.
174. Rosenberg, S.A.; Restifo, N.P. Adoptive Cell Transfer as Personalized Immunotherapy for Human Cancer. *Science* **2015**, *348*, 62–68, doi:10.1126/science.aaa4967.
175. Dudley, M.E.; Rosenberg, S.A. Adoptive Cell Transfer Therapy. *Seminars in Oncology* **2007**, *34*, 524–531, doi:10.1053/j.seminoncol.2007.09.002.
176. Parsonidis, P.; Papisotiriou, I. Adoptive Cellular Transfer Immunotherapies for Cancer. *Cancer Treatment and Research Communications* **2022**, *32*, 100575, doi:10.1016/j.ctarc.2022.100575.
177. Dudley, M.E.; Rosenberg, S.A. Adoptive-Cell-Transfer Therapy for the Treatment of Patients with Cancer. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 666–675, doi:10.1038/nrc1167.
178. Guedan, S.; Ruella, M.; June, C.H. Emerging Cellular Therapies for Cancer. *Annual Review of Immunology* **2019**, *37*, 145–171, doi:10.1146/annurev-immunol-042718-041407.
179. June, C.H.; O'Connor, R.S.; Kawalekar, O.U.; Ghassemi, S.; Milone, M.C. CAR T Cell Immunotherapy for Human Cancer. *Science* **2018**, *359*, 1361–1365, doi:10.1126/science.aar6711.
180. Aramesh, M.; Stoycheva, D.; Raaz, L.; Klotzsch, E. Engineering T-Cell Activation for Immunotherapy by Mechanical Forces. *Current Opinion in Biomedical Engineering* **2019**, *10*, 134–141, doi:10.1016/j.cobme.2019.05.004.
181. Neal, L.R.; Bailey, S.R.; Wyatt, M.M.; Bowers, J.S.; Majchrzak, K.; Nelson, M.H.; Haupt, C.; Paulos, C.M.; Varela, J.C. The Basics of Artificial Antigen Presenting Cells in T Cell-Based Cancer Immunotherapies. *J Immunol Res Ther* **2017**, *2*, 68–79.
182. Butler, M.O.; Hirano, N. Human Cell-Based Artificial Antigen-Presenting Cells for Cancer Immunotherapy. *Immunol Rev* **2014**, *257*, 191–209, doi:10.1111/imr.12129.
183. Kalamasz, D.; Long, S.A.; Taniguchi, R.; Buckner, J.H.; Berenson, R.J.; Bonyhadi, M. Optimization of Human T-Cell Expansion Ex Vivo Using Magnetic Beads Conjugated with Anti-CD3 and Anti-CD28 Antibodies. *J Immunother* **2004**, *27*, 405–418, doi:10.1097/00002371-200409000-00010.
184. Martkamchan, S.; Onlamoon, N.; Wang, S.; Pattanapanyasat, K.; Ammaranond, P. The Effects of Anti-CD3/CD28 Coated Beads and IL-2 on Expanded T Cell for Immunotherapy. *Adv Clin Exp Med* **2016**, *25*, 821–828, doi:10.17219/acem/35771.
185. Roh, K.-H. Artificial Methods for T Cell Activation: Critical Tools in T Cell Biology and T Cell Immunotherapy. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1064*, 207–219, doi:10.1007/978-981-13-0445-3_13.
186. Rasmussen, A.-M.; Borelli, G.; Hoel, H.J.; Lislerud, K.; Gaudernack, G.; Kvalheim, G.; Aarvak, T. Ex Vivo Expansion Protocol for Human Tumor Specific T Cells for Adoptive T Cell Therapy. *J Immunol Methods* **2010**, *355*, 52–60, doi:10.1016/j.jim.2010.02.004.
187. Zheng, Y.; Zha, Y.; Gajewski, T.F. Molecular Regulation of T-Cell Anergy. *EMBO Rep* **2008**, *9*, 50–55, doi:10.1038/sj.embor.7401138.

188. Bujak, J.K.; Pingwara, R.; Nelson, M.H.; Majchrzak, K. Adoptive Cell Transfer: New Perspective Treatment in Veterinary Oncology. *Acta Veterinaria Scandinavica* **2018**, *60*, 60, doi:10.1186/s13028-018-0414-4.
189. Park, J.S.; Withers, S.S.; Modiano, J.F.; Kent, M.S.; Chen, M.; Luna, J.I.; Culp, W.T.N.; Sparger, E.E.; Rebhun, R.B.; Monjaze, A.M.; et al. Canine Cancer Immunotherapy Studies: Linking Mouse and Human. *J. Immunotherapy Cancer* **2016**, *4*, 97, doi:10.1186/s40425-016-0200-7.
190. Bronson, R.T. Variation in Age at Death of Dogs of Different Sexes and Breeds. *Am J Vet Res* **1982**, *43*, 2057–2059.
191. Khanna, C.; Lindblad-Toh, K.; Vail, D.; London, C.; Bergman, P.; Barber, L.; Breen, M.; Kitchell, B.; McNeil, E.; Modiano, J.F.; et al. The Dog as a Cancer Model. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 1065–1066, doi:10.1038/nbt0906-1065b.
192. Fan, T.M.; Selting, K.A. Exploring the Potential Utility of Pet Dogs With Cancer for Studying Radiation-Induced Immunogenic Cell Death Strategies. *Front. Oncol.* **2019**, *8*, doi:10.3389/fonc.2018.00680.
193. Paoloni, M.; Khanna, C. Translation of New Cancer Treatments from Pet Dogs to Humans. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 147–156, doi:10.1038/nrc2273.
194. Mata, M.; Gottschalk, S. Man's Best Friend: Utilizing Naturally Occurring Tumors in Dogs to Improve Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for Human Cancers. *Mol Ther* **2016**, *24*, 1511–1512, doi:10.1038/mt.2016.173.
195. Schiffman, J.D.; Breen, M. Comparative Oncology: What Dogs and Other Species Can Teach Us about Humans with Cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2015**, *370*, 20140231, doi:10.1098/rstb.2014.0231.
196. Chow, L.; Wheat, W.; Ramirez, D.; Impastato, R.; Dow, S. Direct Comparison of Canine and Human Immune Responses Using Transcriptomic and Functional Analyses. *Sci Rep* **2024**, *14*, 2207, doi:10.1038/s41598-023-50340-9.
197. Anderson, K.L.; Modiano, J.F. Progress in Adaptive Immunotherapy for Cancer in Companion Animals: Success on the Path to a Cure. *Vet Sci* **2015**, *2*, 363–387, doi:10.3390/vetsci2040363.
198. Fenger, J.M.; London, C.A.; Kisseberth, W.C. Canine Osteosarcoma: A Naturally Occurring Disease to Inform Pediatric Oncology. *ILAR J* **2014**, *55*, 69–85, doi:10.1093/ilar/ilu009.
199. Almela, R.M.; Ansón, A. A Review of Immunotherapeutic Strategies in Canine Malignant Melanoma. *Vet Sci* **2019**, *6*, 15, doi:10.3390/vetsci6010015.
200. Klingemann, H. Human Immuno-Therapeutics for Cancer Treatment of Dogs? *Front. Vet. Sci.* **2025**, *12*, doi:10.3389/fvets.2025.1593333.
201. Dow, S. A Role for Dogs in Advancing Cancer Immunotherapy Research. *Front Immunol* **2020**, *10*, 2935, doi:10.3389/fimmu.2019.02935.
202. Panjwani, M.K.; Smith, J.B.; Schutsky, K.; Gnanandarajah, J.; O'Connor, C.M.; Powell, D.J.; Mason, N.J. Feasibility and Safety of RNA-Transfected CD20-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells in Dogs with Spontaneous B Cell Lymphoma. *Mol Ther* **2016**, *24*, 1602–1614, doi:10.1038/mt.2016.146.
203. Panjwani, M.K.; Atherton, M.J.; MaloneyHuss, M.A.; Haran, K.P.; Xiong, A.; Gupta, M.; Kulikovsaya, I.; Lacey, S.F.; Mason, N.J. Establishing a Model System for Evaluating CAR T Cell Therapy Using Dogs with Spontaneous Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1676615, doi:10.1080/2162402X.2019.1676615.
204. Klingemann, H. Immunotherapy for Dogs: Running Behind Humans. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 133, doi:10.3389/fimmu.2018.00133.

205. Gordon, I.; Paoloni, M.; Mazcko, C.; Khanna, C. The Comparative Oncology Trials Consortium: Using Spontaneously Occurring Cancers in Dogs to Inform the Cancer Drug Development Pathway. *PLoS Med* **2009**, *6*, e1000161, doi:10.1371/journal.pmed.1000161.
206. Kato, M.; Watarai, S.; Nishikawa, S.; Iwasaki, T.; Kodama, H. A Novel Culture Method of Canine Peripheral Blood Lymphocytes with Concanavalin A and Recombinant Human Interleukin-2 for Adoptive Immunotherapy. *J. Vet. Med. Sci.* **2007**, *69*, 481–486, doi:10.1292/jvms.69.481.
207. Hartley, A.N.; Tarleton, R.L. Chemokine Receptor 7 (CCR7)-Expression and IFN γ Production Define Vaccine-Specific Canine T-Cell Subsets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2015**, *164*, 127–136, doi:10.1016/j.vetimm.2015.02.001.
208. Mizuno, S.; Fujinaga, T.; Kurosawa, T. Augmentative Effects of Phytohemagglutinin-P on Proliferation and Cytotoxicity of Interleukin-2-activated Canine Peripheral Blood Lymphocytes. *Journal of Veterinary Medicine Series A* **1996**, *43*, 289–296, doi:10.1111/j.1439-0442.1996.tb00455.x.
209. Shelton, G.D.; Fujii, Y.; Lindstrom, J. Mitogen Stimulation of Canine Normal and Myasthenia Gravis Lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **1990**, *24*, 1–9, doi:10.1016/0165-2427(90)90073-2.
210. Bae, S.; Kim, K.; Oh, T. The Effect of an *Ex Vivo* Boosted Immune Cell Therapy on Canine Atopic Dermatitis: An Open, Uncontrolled Pilot Study. *Veterinary Dermatology* **2018**, *29*, 504, doi:10.1111/vde.12687.
211. Itoh, H.; Kakuta, T.; Kudo, T.; Sakonju, I.; Hohdatsu, T.; Ebina, T.; Takase, K. Bulk Cultures of Canine Peripheral Blood Lymphocytes with Solid Phase Anti-CD3 Antibody and Recombinant Interleukin-2 for Use in Immunotherapy. *J. Vet. Med. Sci.* **2003**, *65*, 329–333, doi:10.1292/jvms.65.329.
212. Hoshino, Y.; Takagi, S.; Osaki, T.; Okumura, M.; Fujinaga, T. Phenotypic Analysis and Effects of Sequential Administration of Activated Canine Lymphocytes on Healthy Beagles. *J. Vet. Med. Sci.* **2008**, *70*, 581–588, doi:10.1292/jvms.70.581.
213. Graves, S.S.; Stone, D.M.; Loretz, C.; Peterson, L.J.; Lesnikova, M.; Hwang, B.; Georges, G.E.; Nash, R.; Storb, R. Antagonistic and Agonistic Anti-Canine CD28 Monoclonal Antibodies: Tools for Allogeneic Transplantation. *Transplantation* **2011**, *91*, 833–840, doi:10.1097/TP.0b013e31820f07ff.
214. Oelke, M.; Krueger, C.; Giuntoli, R.; Schneck, J. Artificial Antigen-Presenting Cells: Artificial Solutions for Real Diseases. *Trends in Molecular Medicine* **2005**, *11*, 412–420, doi:10.1016/j.molmed.2005.07.005.
215. Paulos, C.M.; Carpenito, C.; Plesa, G.; Suhoski, M.M.; Varela-Rohena, A.; Golovina, T.N.; Carroll, R.G.; Riley, J.L.; June, C.H. The Inducible Costimulator (ICOS) Is Critical for the Development of Human T_H 17 Cells. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2*, doi:10.1126/scitranslmed.3000448.
216. O'Connor, C.M.; Sheppard, S.; Hartline, C.A.; Huls, H.; Johnson, M.; Palla, S.L.; Maiti, S.; Ma, W.; Davis, R.E.; Craig, S.; et al. Adoptive T-Cell Therapy Improves Treatment of Canine Non-Hodgkin Lymphoma Post Chemotherapy. *Sci Rep* **2012**, *2*, 249, doi:10.1038/srep00249.
217. Mata, M.; Vera, J.F.; Gerken, C.; Rooney, C.M.; Miller, T.; Pfent, C.; Wang, L.L.; Wilson-Robles, H.M.; Gottschalk, S. Toward Immunotherapy With Redirected T Cells in a Large Animal Model: Ex Vivo Activation, Expansion, and Genetic Modification of Canine T Cells. *Journal of Immunotherapy* **2014**, *37*, 407–415, doi:10.1097/CJI.0000000000000052.
218. Carr, W.H.; Zinsou, C.; Rowe, T.; Lange, C.; Lawal, O.O. Human Natural Killer Cell Expansion in Vitro Using Mitomycin-C Treatment as an Alternative to Irradiation

- of Modified K562 Feeder Cells. *J Immunol* **2017**, *198*, 82.16, doi:10.4049/jimmunol.198.Supp.82.16.
219. Rotolo, A.; Atherton, M.J.; Kasper, B.T.; Haran, K.P.; Mason, N.J. Genetic Re-Direction of Canine Primary T Cells for Clinical Trial Use in Pet Dogs with Spontaneous Cancer. *STAR Protocols* **2021**, *2*, 100905, doi:10.1016/j.xpro.2021.100905.
 220. Porter, D.L.; Hwang, W.-T.; Frey, N.V.; Lacey, S.F.; Shaw, P.A.; Loren, A.W.; Bagg, A.; Marcucci, K.T.; Shen, A.; Gonzalez, V.; et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells Persist and Induce Sustained Remissions in Relapsed Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, doi:10.1126/scitranslmed.aac5415.
 221. Wang, X.; Rivière, I. Clinical Manufacturing of CAR T Cells: Foundation of a Promising Therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics* **2016**, *3*, 16015, doi:10.1038/mto.2016.15.
 222. Kreissl, H.; Neiger, R. Measurement of Body Temperature in 300 Dogs with a Novel Noncontact Infrared Thermometer on the Cornea in Comparison to a Standard Rectal Digital Thermometer. *J Vet Emergen Crit Care* **2015**, *25*, 372–378, doi:10.1111/vec.12302.
 223. Tran, S.E.F.; Meinander, A.; Holmström, T.H.; Rivero-Müller, A.; Heiskanen, K.M.; Linnau, E.K.; Courtney, M.J.; Mosser, D.D.; Sistonen, L.; Eriksson, J.E. Heat Stress Downregulates FLIP and Sensitizes Cells to Fas Receptor-Mediated Apoptosis. *Cell Death Differ* **2003**, *10*, 1137–1147, doi:10.1038/sj.cdd.4401278.
 224. Sakai, O.; Igase, M.; Mizuno, T. Optimization of Canine CD20 Chimeric Antigen Receptor T Cell Manufacturing and in Vitro Cytotoxic Activity against B-cell Lymphoma. *Vet Comparative Oncology* **2020**, *18*, 739–752, doi:10.1111/vco.12602.
 225. Yin, Y.; Boesteanu, A.C.; Binder, Z.A.; Xu, C.; Reid, R.A.; Rodriguez, J.L.; Cook, D.R.; Thokala, R.; Blouch, K.; McGettigan-Croce, B.; et al. Checkpoint Blockade Reverses Anergy in IL-13R α 2 Humanized scFv-Based CAR T Cells to Treat Murine and Canine Gliomas. *Molecular Therapy - Oncolytics* **2018**, *11*, 20–38, doi:10.1016/j.omto.2018.08.002.
 226. Mace, T.A.; Zhong, L.; Kilpatrick, C.; Zynda, E.; Lee, C.-T.; Capitano, M.; Minderman, H.; Repasky, E.A. Differentiation of CD8⁺ T Cells into Effector Cells Is Enhanced by Physiological Range Hyperthermia. *Journal of Leukocyte Biology* **2011**, *90*, 951–962, doi:10.1189/jlb.0511229.
 227. Sikora, E. Activation-Induced and Damage-Induced Cell Death in Aging Human T Cells. *Mechanisms of Ageing and Development* **2015**, *151*, 85–92, doi:10.1016/j.mad.2015.03.011.
 228. Green, D.R.; Droin, N.; Pinkoski, M. Activation-induced Cell Death in T Cells. *Immunological Reviews* **2003**, *193*, 70–81, doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00051.x.
 229. Li, Y.; Kurlander, R.J. Comparison of Anti-CD3 and Anti-CD28-Coated Beads with Soluble Anti-CD3 for Expanding Human T Cells: Differing Impact on CD8 T Cell Phenotype and Responsiveness to Restimulation. *J Transl Med* **2010**, *8*, 104, doi:10.1186/1479-5876-8-104.
 230. Yasuda, T.; Kurosaki, T. Regulation of Lymphocyte Fate by Ras/ERK Signals. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 3634–3640, doi:10.4161/cc.7.23.7103.
 231. Yao, Z.; Dolginov, Y.; Hanoch, T.; Yung, Y.; Ridner, G.; Lando, Z.; Zharhary, D.; Seger, R. Detection of Partially Phosphorylated Forms of ERK by Monoclonal Antibodies Reveals Spatial Regulation of ERK Activity by Phosphatases. *FEBS Lett* **2000**, *468*, 37–42, doi:10.1016/s0014-5793(00)01191-1.

232. Nguyen, T.T.; Scimeca, J.C.; Filloux, C.; Peraldi, P.; Carpentier, J.L.; Van Obberghen, E. Co-Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase, Extracellular Signal-Regulated Kinase 1, and the 90-kDa Ribosomal S6 Kinase in PC12 Cells. Distinct Effects of the Neurotrophic Factor, Nerve Growth Factor, and the Mitogenic Factor, Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 9803–9810.
233. Marshall, C.J. Specificity of Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Transient versus Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Cell* **1995**, *80*, 179–185, doi:10.1016/0092-8674(95)90401-8.
234. Park, S.-G.; Schulze-Luehrman, J.; Hayden, M.S.; Hashimoto, N.; Ogawa, W.; Kasuga, M.; Ghosh, S. The Kinase PDK1 Integrates T Cell Antigen Receptor and CD28 Coreceptor Signaling to Induce NF- κ B and Activate T Cells. *Nat Immunol* **2009**, *10*, 158–166, doi:10.1038/ni.1687.
235. Ritt, M.; Lindborg, B.; O'Brien, T.; Bisignano, J.; Modiano, J. Stimulation with Concanavalin-A Induces IL-17 Production by Canine Peripheral T Cells. *Veterinary Sciences* **2015**, *2*, 43–51, doi:10.3390/vetsci2020043.
236. Kol, A.; Walker, N.J.; Nordstrom, M.; Borjesson, D.L. Th17 Pathway As a Target for Multipotent Stromal Cell Therapy in Dogs: Implications for Translational Research. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148568, doi:10.1371/journal.pone.0148568.
237. Majchrzak, K.; Nelson, M.H.; Bowers, J.S.; Bailey, S.R.; Wyatt, M.M.; Wrangle, J.M.; Rubinstein, M.P.; Varela, J.C.; Li, Z.; Himes, R.A.; et al. β -Catenin and PI3K δ Inhibition Expands Precursor Th17 Cells with Heightened Stemness and Antitumor Activity. *JCI Insight* **2017**, *2*, e90547, doi:10.1172/jci.insight.90547.
238. Lee, Y.-S.; Lee, K.-A.; Yoon, H.-B.; Yoo, S.-A.; Park, Y.W.; Chung, Y.; Kim, W.-U.; Kang, C.-Y. The Wnt Inhibitor Secreted Frizzled-Related Protein 1 (sFRP1) Promotes Human Th17 Differentiation. *European Journal of Immunology* **2012**, *42*, 2564–2573, doi:10.1002/eji.201242445.
239. Staal, F.J.T.; Luis, T.C.; Tiemessen, M.M. WNT Signalling in the Immune System: WNT Is Spreading Its Wings. *Nat Rev Immunol* **2008**, *8*, 581–593, doi:10.1038/nri2360.
240. Fleming, H.E.; Janzen, V.; Lo Celso, C.; Guo, J.; Leahy, K.M.; Kronenberg, H.M.; Scadden, D.T. Wnt Signaling in the Niche Enforces Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Is Necessary to Preserve Self-Renewal in Vivo. *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 274–283, doi:10.1016/j.stem.2008.01.003.
241. Mulroy, T.; McMahon, J.A.; Burakoff, S.J.; McMahon, A.P.; Sen, J. Wnt-1 and Wnt-4 Regulate Thymic Cellularity. *Eur J Immunol* **2002**, *32*, 967–971, doi:10.1002/1521-4141(200204)32:4%3C967::AID-IMMU967%3E3.0.CO;2-6.
242. Okamura, R.M.; Sigvardsson, M.; Galceran, J.; Verbeek, S.; Clevers, H.; Grosschedl, R. Redundant Regulation of T Cell Differentiation and TCR α Gene Expression by the Transcription Factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* **1998**, *8*, 11–20, doi:10.1016/s1074-7613(00)80454-9.
243. Muralidharan, S.; Hanley, P.J.; Liu, E.; Chakraborty, R.; Bollard, C.; Shpall, E.; Rooney, C.; Savoldo, B.; Rodgers, J.; Dotti, G. Activation of Wnt Signaling Arrests Effector Differentiation in Human Peripheral and Cord Blood-Derived T Lymphocytes. *J Immunol* **2011**, *187*, 5221–5232, doi:10.4049/jimmunol.1101585.
244. Willinger, T.; Freeman, T.; Herbert, M.; Hasegawa, H.; McMichael, A.J.; Callan, M.F.C. Human Naive CD8 T Cells Down-Regulate Expression of the WNT Pathway Transcription Factors Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 and Transcription Factor 7 (T Cell Factor-1) Following Antigen Encounter in Vitro and in Vivo. *J Immunol* **2006**, *176*, 1439–1446, doi:10.4049/jimmunol.176.3.1439.

245. Huang, S.-M.A.; Mishina, Y.M.; Liu, S.; Cheung, A.; Stegmeier, F.; Michaud, G.A.; Charlat, O.; Wiелlette, E.; Zhang, Y.; Wiessner, S.; et al. Tankyrase Inhibition Stabilizes Axin and Antagonizes Wnt Signalling. *Nature* **2009**, *461*, 614–620, doi:10.1038/nature08356.
246. Wu, X.; Luo, F.; Li, J.; Zhong, X.; Liu, K. Tankyrase 1 Inhibitor XAV939 Increases Chemosensitivity in Colon Cancer Cell Lines via Inhibition of the Wnt Signaling Pathway. *International Journal of Oncology* **2016**, *48*, 1333–1340, doi:10.3892/ijo.2016.3360.
247. Chen, Y.; Zheng, L.; Aldarouish, M.; Zhou, Z.; Pan, N.; Liu, J.; Chen, F.; Wang, L. Wnt Pathway Activator TWS119 Enhances the Proliferation and Cytolytic Activity of Human $\gamma\delta$ T Cells against Colon Cancer. *Experimental Cell Research* **2018**, *362*, 63–71, doi:10.1016/j.yexcr.2017.11.003.
248. Blobaum, A.L.; Uddin, Md.J.; Felts, A.S.; Crews, B.C.; Rouzer, C.A.; Marnett, L.J. The 2'-Trifluoromethyl Analogue of Indomethacin Is a Potent and Selective COX-2 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett* **2013**, *4*, 486–490, doi:10.1021/ml400066a.
249. Luz-Crawford, P.; Kurte, M.; Bravo-Alegria, J.; Contreras, R.; Nova-Lamperti, E.; Tejedor, G.; Noël, D.; Jorgensen, C.; Figueroa, F.; Djouad, F.; et al. Mesenchymal Stem Cells Generate a CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cell Population during the Differentiation Process of Th1 and Th17 Cells. *Stem Cell Research & Therapy* **2013**, *4*, 65, doi:10.1186/scrt216.
250. Hawcroft, G.; D'Amico, M.; Albanese, C.; Markham, A.F.; Pestell, R.G.; Hull, M.A. Indomethacin Induces Differential Expression of β -Catenin, γ -Catenin and T-Cell Factor Target Genes in Human Colorectal Cancer Cells. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 107–114, doi:10.1093/carcin/23.1.107.
251. Dihlmann, S.; Siemann, A.; von Knebel Doeberitz, M. The Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Aspirin and Indomethacin Attenuate Beta-Catenin/TCF-4 Signaling. *Oncogene* **2001**, *20*, 645–653, doi:10.1038/sj.onc.1204123.
252. Dihlmann, S.; Klein, S.; Doeberitz Mv, M. von K. Reduction of Beta-Catenin/T-Cell Transcription Factor Signaling by Aspirin and Indomethacin Is Caused by an Increased Stabilization of Phosphorylated Beta-Catenin. *Mol Cancer Ther* **2003**, *2*, 509–516.
253. Yadav, S.K.; Adhikary, B.; Chand, S.; Maity, B.; Bandyopadhyay, S.K.; Chattopadhyay, S. Molecular Mechanism of Indomethacin-Induced Gastropathy. *Free Radical Biology and Medicine* **2012**, *52*, 1175–1187, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.023.
254. Shen, Y.; Yang, T.; Wang, J.; Xu, Q.; Li, R.; Pan, W.; Li, G.; Wang, Z.; Tan, J.; Wu, J.; et al. Indomethacin Enhances the Cytotoxicity of Recombinant Human Lymphotoxin α on Tumor Cells by Suppressing NF- κ B Signaling. *Cancer Biology & Therapy* **2007**, *6*, 1424–1429, doi:10.4161/cbt.6.9.4559.
255. Zhao, X.; Wang, T.; Li, N.; Meng, Z.; Wang, W.; Wang, B.; Song, D. Potential Effects of Indomethacin on Alleviating Osteoarthritis Progression in Vitro. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2024**, *24*, 409–419.
256. Gattinoni, L.; Zhong, X.-S.; Palmer, D.C.; Ji, Y.; Hinrichs, C.S.; Yu, Z.; Wrzesinski, C.; Boni, A.; Cassard, L.; Garvin, L.M.; et al. Wnt Signaling Arrests Effector T Cell Differentiation and Generates CD8+ Memory Stem Cells. *Nat Med* **2009**, *15*, 808–813, doi:10.1038/nm.1982.
257. Gattinoni, L.; Speiser, D.E.; Lichterfeld, M.; Bonini, C. T Memory Stem Cells in Health and Disease. *Nat Med* **2017**, *23*, 18–27, doi:10.1038/nm.4241.
258. Gattinoni, L.; Klebanoff, C.A.; Palmer, D.C.; Wrzesinski, C.; Kerstann, K.; Yu, Z.; Finkelstein, S.E.; Theoret, M.R.; Rosenberg, S.A.; Restifo, N.P. Acquisition of Full

- Effector Function in Vitro Paradoxically Impairs the in Vivo Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred CD8⁺ T Cells. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 1616–1626, doi:10.1172/JCI24480.
259. Rangel Rivera, G.O.; Knochelmann, H.M.; Dwyer, C.J.; Smith, A.S.; Wyatt, M.M.; Rivera-Reyes, A.M.; Thaxton, J.E.; Paulos, C.M. Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fimmu.2021.645242.
 260. Chapman, N.M.; Boothby, M.R.; Chi, H. Metabolic Coordination of T Cell Quiescence and Activation. *Nat Rev Immunol* **2020**, *20*, 55–70, doi:10.1038/s41577-019-0203-y.
 261. Oberholtzer, N.; Quinn, K.M.; Chakraborty, P.; Mehrotra, S. New Developments in T Cell Immunometabolism and Implications for Cancer Immunotherapy. *Cells* **2022**, *11*, 708, doi:10.3390/cells11040708.
 262. Ma, S.; Ming, Y.; Wu, J.; Cui, G. Cellular Metabolism Regulates the Differentiation and Function of T-Cell Subsets. *Cell Mol Immunol* **2024**, *21*, 419–435, doi:10.1038/s41423-024-01148-8.
 263. Shin, B.; Benavides, G.A.; Geng, J.; Korolov, S.B.; Hu, H.; Darley-Usmar, V.M.; Harrington, L.E. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Regulates the Fate Decision between Pathogenic Th17 and Regulatory T Cells. *Cell Reports* **2020**, *30*, 1898–1909.e4, doi:10.1016/j.celrep.2020.01.022.
 264. Chatterjee, S.; Daenthanasamak, A.; Chakraborty, P.; Wyatt, M.W.; Dhar, P.; Selvam, S.P.; Fu, J.; Zhang, J.; Nguyen, H.; Kang, I.; et al. CD38-NAD⁺ Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metabolism* **2018**, *27*, 85–100.e8, doi:10.1016/j.cmet.2017.10.006.
 265. Dwyer, C.J.; Arhontoulis, D.C.; Rangel Rivera, G.O.; Knochelmann, H.M.; Smith, A.S.; Wyatt, M.M.; Rubinstein, M.P.; Atkinson, C.; Thaxton, J.E.; Neskey, D.M.; et al. Ex Vivo Blockade of PI3K Gamma or Delta Signaling Enhances the Antitumor Potency of Adoptively Transferred CD8⁺ T Cells. *Eur J Immunol* **2020**, *50*, 1386–1399, doi:10.1002/eji.201948455.
 266. Vallée, A.; Guillevin, R.; Vallée, J.-N. Vasculogenesis and Angiogenesis Initiation under Normoxic Conditions through Wnt/ β -Catenin Pathway in Gliomas. *Rev Neurosci* **2018**, *29*, 71–91, doi:10.1515/revneuro-2017-0032.
 267. Karmaus, P.W.F.; Chen, X.; Lim, S.A.; Herrada, A.A.; Nguyen, T.-L.M.; Xu, B.; Dhungana, Y.; Rankin, S.; Chen, W.; Rosencrance, C.; et al. Metabolic Heterogeneity Underlies Reciprocal Fates of TH17 Cell Stemness and Plasticity. *Nature* **2019**, *565*, 101–105, doi:10.1038/s41586-018-0806-7.

**9. Publikacje wchodzące w skład jednotematycznego cyklu oraz oświadczenia
współautorów**



Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach

Iwona Monika Szopa¹, Monika Granica¹, Joanna Katarzyna Bujak^{1,2}, Agata Łabędź¹, Maciej Błaszczyk¹, Chrystal Mary Paulos³ and Kinga Majchrzak-Kuligowska^{1*}

¹ Department of Physiological Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland, ² Department of Physics and Biophysics, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Poland, ³ Department of Surgery, Department of Microbiology and Immunology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabrizio Cecilian, University of Milan, Italy

Reviewed by:

Jodi L. McGill, Iowa State University, United States
Nicola Mason, University of Pennsylvania, United States
Andrzej Rapak, Polish Academy of Sciences, Poland

*Correspondence:

Kinga Majchrzak-Kuligowska
kinga_majchrzak@sggw.edu.pl

Specialty section:

This article was submitted to Comparative Immunology, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 08 September 2020

Accepted: 04 January 2021

Published: 19 February 2021

Citation:

Szopa IM, Granica M, Bujak JK, Łabędź A, Błaszczyk M, Paulos CM and Majchrzak-Kuligowska K (2021) Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach. *Front. Immunol.* 12:604066. doi: 10.3389/fimmu.2021.604066

Expansion protocols for human T lymphocytes using magnetic beads, which serve as artificial antigen presenting cells (aAPCs), is well-studied. Yet, the efficacy of magnetic beads for propagation and functionality of peripheral blood lymphocytes (PBLs) isolated from companion dogs still remains limited. Domestic dog models are important in immuno-oncology field. Thus, we built the platform for induction of canine PBLs function, proliferation and biological activity using nano-sized magnetic beads (termed as MicroBeads) coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies. Herein we reveal that activation of canine PBLs via MicroBeads induces a range of genes involved in immediate-early response to T cell activation in dogs. Furthermore, canine T lymphocytes are effectively activated by MicroBeads, as measured by cluster formation and induction of activation marker CD25 on canine T cells as quickly as 24 h post stimulation. Similar to human T cells, canine PBLs require lower activation signal strength for efficient proliferation and expansion, as revealed by titration studies using a range of MicroBeads in the culture. Additionally, the impact of temperature was assessed in multiple stimulation settings, showing that both 37°C and 38.5°C are optimal for the expansion of canine T cells. In contrast to stimulation using plant mitogen Concanavalin A (ConA), MicroBead-based activation did not increase activation-induced cell death. In turn, MicroBeads supported the propagation of T cells with an effector memory phenotype that secreted substantial IL-2 and IFN- γ . Thus, MicroBeads represent an accessible and affordable tool for conducting immunological studies on domestic dog models. Similarities in inducing intracellular signaling pathways further underscore the importance of this model in comparative medicine. Presented herein MicroBead-based expansion platforms for canine PBLs may benefit adoptive immunotherapy in dogs and facilitate the design of next-generation clinical trials in humans.

Keywords: adoptive cell transfer, canine T cells, cellular immunotherapy, domestic dog model, microbeads

INTRODUCTION

Adaptive immune responses rely on robust clonal expansion of antigen-specific T lymphocytes. Naïve T cells need to be activated by antigen presenting cells (APC), in order to proliferate and differentiate into specialized effector cells (1). In domestic dogs (*Canis lupus familiaris*), similarly to humans, activation process involves recognition of antigenic protein displayed by APCs in the context of the major histocompatibility complex molecule (MHC), known as the dog leukocyte antigen (DLA) for dogs. During cell-to-cell contact, the surface T cell receptor (TCR) binds the antigen presented within the immunological synapse (2, 3). The engagement of TCR is often referred to as “signal 1”, which triggers intracellular signaling pathways leading to activation of genes involved in T cells expansion and biological activity. The TCR is associated with a complex of transmembrane and intracellular proteins (CD3 complex) and co-receptors, such as CD4 and CD8 molecules, which enable signal transduction to the nucleus leading to cytokine production or actin cytoskeletal rearrangement. In addition to TCR-dependent antigen recognition, a costimulatory signal (“signal 2”) is necessary for the activation of naïve T cells (4, 5). One of the most important co-stimulatory receptors is CD28, which is constitutively expressed on canine T lymphocytes (6). Other co-stimulatory molecules such as CD137 (41BB) or inducible costimulator (ICOS) have been shown to be up-regulated on the surface of activated T cells (7, 8). Prolonged recognition of antigen alone, without co-stimulatory signal leads to T cells anergy and development of self-tolerance (9).

The platform enabling extensive propagation of T cells isolated from domestic dogs is important for immunological research as well as for the development of novel immunotherapy in veterinary medicine, and adoptive cell transfer (ACT) therapy in particular. ACT therapy has shown enormous efficiency in eradicating human hematological malignancies, melanomas, gastrointestinal and epithelial cancers (10–12). This treatment involves isolation of T lymphocytes either from peripheral blood or tumor tissue; their activation and genetic modifications, followed by the long-term expansion and re-infusion back to the oncological patients (10). The specificity against malignant cells is acquired by transfecting the T cells with tumor-specific engineered TCRs or chimeric antigen receptors (CARs). The feasibility and safety of ACT therapy have been recently proven in dogs with non-Hodgkin lymphoma (NHL) (13), spontaneous B cell lymphoma (14–16) and glioma (17). Thus, it is warranted to exploit this regimen in other canine malignancies (18). Importantly, ACT therapy in dogs is also of great interest for comparative and translational medicine, due to the opportunity to evaluate novel immune-modulators and adequately assess adverse effects of innovative CAR-based immunotherapies (19, 20). Noteworthy, the companion dog model has been greatly appreciated, firstly by American National Cancer Institute (NCI) and initiation of the Comparative Oncology Program with the goal to enhance studies on large animal models, that could facilitate human clinical trials design, especially in immunology field (21, 22). Resulting in the formation of the

Pre-clinical Cancer Immunotherapy Network for Canine Trials (PRECINCT) as a part of the Cancer Moonshot program. Therefore, in our study we developed a new methodology for activation and expansion of canine peripheral blood lymphocytes (cPBLs) using nano-sized magnetic beads in contrast to previously published Dynabeads-based approach (14, 15). Thus, creating a platform for future investigations of co-stimulatory mechanism and differentiation of canine T lymphocytes.

Human T lymphocytes undergo successful *ex vivo* expansion with magnetic beads coated with agonistic antibody that provided activation “signal 1” and “2” in the presence of IL-2, which is a well-known immune cells growth factor (23). Currently several manufacturers offer commercial kits for the multiplication of human T lymphocytes in clinical settings, e.g. CTS Dynabeads CD3/28 from Invitrogen, magnetic beads MACS GMP TransAct CD3/28 from Miltenyi Biotec and Stage Expamer technology from Juno Therapeutics (24).

Nevertheless, data concerning efficacy of magnetic beads in expansion protocols of T lymphocytes isolated from peripheral blood of domestic dogs still remains limited. Moreover, the optimal culture conditions of canine T cells in terms of activation signal strength and temperature have not been tested. Therefore, we investigated the impact of nano-sized magnetic beads (termed as MicroBeads) coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies on canine T cells activation, proliferation, apoptosis, memory phenotype and cytokine production as well as induction of intracellular signaling pathways. In our work, we have used Miltenyi Biotec MicroBeads instead of previously reported in dog studies Dynabeads-based technique (15, 16). We used nano-sized magnetic beads, because apart from the much small diameter of about 50nm, they are also biodegradable and therefore do not require removal before transfer. It was also shown that magnetic field-enhanced stimulation by nano-sized beads increased murine T cell expansion *in vitro* and after adoptive cell transfer to mice (24–26). Various ratios of T cell to MicroBeads were applied in our study to determine optimal activation signal strength for substantial canine T cell growth in comparison to commonly use plant mitogen—Concanavalin A (ConA). Additionally, we assessed the influence of the temperature in multiple stimulation settings. Importantly, our results indicate this novel platform used on domestic dog model promotes both the proliferation and function (e.g., IFN- γ production) by T lymphocytes.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and Activation of Canine Peripheral Blood Lymphocytes

Canine peripheral blood lymphocytes (PBLs) were isolated from fresh whole blood, obtained from healthy client-owned dogs (n=6) that serve as volunteer blood donors at Warsaw Specialist Blood Bank on an institutionally approved protocol. Blood was obtained during routine veterinary procedures and informed

consent was received from all dog owners. Only healthy dogs vaccinated against infectious diseases (Parvovirus, Distemper virus, Adenovirus-2, Parainfluenza virus and Rabies) and receiving regular anti-helminthic treatment were included in the study.

Whole anticoagulated blood was diluted 1:3 in sterile phosphate buffered saline (PBS) and immediately subjected to mono-nuclear cell separation on Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) density centrifugation at $800 \times g$ for 30 min at room temperature (RT). After washing with PBS supplemented with 2mM EDTA and 0.5% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) cells were treated with erythrocyte lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) for 5min at RT followed by washing with PBS supplemented 3% FBS. Isolated canine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were enumerated using automated cell counter and 4% Trypan blue (Countess II Automated Cell Counter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Cells were resuspended in RPMI-1640 GlutaMAXTM medium containing 0.1% HEPES, 10% FBS, 1% Sodium pyruvate, 1% Nonessential amino acids, 1% penicillin and streptomycin (all from Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). PBMCs were cultured overnight (37°C, 5% CO₂) for monocyte/macrophage depletion *via* plastic adherence at a density of 2×10^6 cells/ml in 6-well plates (Corning, New York, USA). Non-adherent canine PBLs were collected next day and counted.

Enriched PBLs were seeded at a density of 1×10^6 cells/ml and activated with nano-sized magnetic beads (terms as MicroBeads) from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) or Concanavalin A (ConA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in multi-well plates (Corning, New York, USA) without agitation. Magnetic beads were coated with cross-linking anti-canine CD3 antibody (clone CA17.2A12, Bio-Rad, Hercules, USA) and anti-canine CD28 agonist (clone 1C6, Functional Grade, eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) at the concentration recommended by the manufacturer. Final concentration was 0.5 µg of each antibody per 1 ml of cell medium containing 1×10^6 PBLs, which was indicated as a 1:1 ratio of T cell to MicroBeads. To activate lymphocytes with different signal strength, cells were incubated at either 1:2, 1:1, 1:0.5, 1:0.25 or a 1:0.125 of T cell to MicroBeads ratio, or with 5µg/ml ConA, a natural mitogen. To compare efficiency of activation using two types of beads, cells were activated independently with MicroBeads or Dynabeads M-450 Epoxy (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Dynabeads were coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies, similarly to MicroBeads. For expansion experiments PBLs were split and supplemented with 10 ng/ml recombinant canine IL-2 (R&D systems, Minneapolis, USA) starting from day 3 of culture. To assess the impact of temperature PBLs were incubated in 33°C, 37°C, 38.5°C, 40°C or 41°C in humidified incubator, 5% CO₂ (Sanyo Electric, Ltd., Japan) and visualized using BX60 microscope (Olympus Optical Co., Germany). Cells were harvested on the days indicated and used for gene expression analysis (Real-time PCR), flow cytometry analysis and Western blot assay.

RNA Isolation, cDNA Synthesis, and Real-Time PCR Analysis

Canine PBLs were harvested 3, 6 and 24 h post activation, washed with sterile PBS and centrifuged at 1,200 rpm for 4 min. Cell pellets were resuspended immediately in 100 µl of Lysis solution and total RNA was isolated using RNAqueousTM—Micro Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) according to the manufacturer's recommendations. Samples were DNase treated and RNA concentration was determined using NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, USA). One microgram of total RNA was transcribed with the High-capacity FG RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Quantitative PCR was performed using SYBR Green Select Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follow: initial polymerase activation at 95°C for 2 min, followed by 40 amplification cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 58°C for 15 s and elongation/extension 72°C for 60s in the Stratagene Mx3005P Light Cycler (Agilent Technologies, USA) using MxPro QPCR Software.

The primers for *CD69* and *CD25* were designed *de novo* using PRIMER3 software (free online access, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) and checked using an Oligo Calculator (free online access, <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) and Primer-Blast (NCBI database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Melting curve analysis was performed for 30 s for each 1°C interval from 58 to 95°C and amplicons were also analyzed using 2% agarose gel electrophoresis. The other primers used in our study (*PTGS2*, *FOS*, *EGR2*, *RGS1*, *GADD45B*) were reported previously by Mortlock et al. (27). *RPS19* and *HPRT* genes were used as a non-regulated reference (housekeeping) for normalization of the target gene expression. The relative mRNA expression was calculated using the comparative Ct method (28) as $2^{-\Delta Ct}$, ($\Delta Ct = Ct_{\text{reference}} - Ct_{\text{target}}$). The sequences of primers used for qPCR are listed in **Table 1**.

Flow Cytometry Analysis

PBLs were washed with sterile FACS buffer (PBS supplemented with 2% FBS). Non-specific antibody binding was blocked by pre-treatment of cells with Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody, (eBioscienceTM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) for 20 min at 4°C. Then the cells were resuspended in 100 µl of FACS buffer and stained with a viability dye Zombie aqua-v500 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and with mouse primary antibodies for 30 min at RT. To analyze expression level of surface molecules and activation markers the following antibodies were used: anti-canine CD4-APC (clone YKIX302.9), anti-canine CD5-PerCP (clone YKIX322.3), anti-canine CD8α-v450 (clone YCATE55.9) and anti-canine CD25-FITC (clone P4A10) (all purchased from eBioscienceTM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), according to the manufacturer's recommendation. For memory phenotype staining the rat anti-canine CD44-PE (clone

TABLE 1 | Sequence of primers used in Real-time PCR.

Gene	Starters sequence (F – Forward, R – Reverse)
CD25	F: 5'-ACTCCAGATTTCCACAAACACACA-3' R: 5'-GCTCTTCTTGGCTTCTTACCACT-3'
CD69	F: 5'-AGGGTGCTACTCTTGGCTT-3' R: 5'-CAGTAAGGTTGAGCCAGTTGC-3'
FOS	F: 5'-GGAACAGGAGACAGACCAAC-3' R: 5'-TAGGGAAGCCACGGACATC-3'
PTGS2	F: 5'-ATGGGTGTGAAAGGCAAGAA-3' R: 5'-TGATGGGTAAAGTGCTGGGC-3'
EGR2	F: 5'-GCCGTAGACAAAATCCCAGT-3' R: 5'-CCAAGGACCTCTTCTCTCCA-3'
RGS1	F: 5'-ATTGAGTTCTGGCTGGCTTG-3' R: 5'-CGTAGGGGTTGGTGCTTTA-3'
GADD45B	F: 5'-CTGGTCACGAACCTCACAC-3' R: 5'-TCAACAGGCTCTGATGCTGG-3'
HPRT1	F: 5'-TTATAGTCAAGGGCATATCC-3' R: 5'-AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC-3'
RPS19	F: 5'-GTTCTCATCGTAGGGAGCAAG-3' R: 5'-CCTTCCTCAAAAAGTCTGGG-3'

YKIX337.8.7) and CD62L (clone FMC46) were used (Bio-Rad, Hercules, USA). In addition, corresponding mouse and rat IgG1 and IgG2 isotype controls (Bio-Rad, Hercules, USA) were used to determine the level of background surface staining. After incubation with antibodies, cells were washed twice with FACS buffer, centrifuged at 1,200 rpm for 4 min and resuspended in 200 μ L of FACS buffer for analysis. Flow cytometry acquisition was performed on a BD FACS Aria II flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). A total of 50,000 events per sample were acquired. Data were analyzed with FlowJo software (TreeStar Inc., Ashland, USA). Lymphocytes were gated with respect to their size and granularity and doublets as well as dead cells were excluded from analysis.

Cell Proliferation Assay

To assess the expansion of lymphocytes CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was applied. A stock solution was prepared according to the manufacturer's protocol. Cells were washed with PBS and resuspend in PBS with 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Per 1 mL of cell suspension, 1 μ L of stock solution was used. Cells were incubated with CellTrace™ Far Red dye for 15 min at 37°C protected from light with gentle agitation, followed by 5 min incubation in complete cell medium in order to remove any residual dye remaining in the solution. After wash with cell medium, cells were activated with 5 μ g/mL ConA or with MicroBeads at different ratios as described above. Cells were harvested before activation (0h) and 2, 4, and 6 days post activation. The cell suspension was fixed for 20 min at RT using Fixation buffer (eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Cell Apoptosis and Metabolic Activity Assay

In order to analyze activation induced cell death and metabolic activity of PBLs, the Metabolic Activity Dead Cell Apoptosis Kit with C12 Resazurin, Annexin V, and SYTOX™ Green

(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) was used. PBLs were stimulated using 5 μ g/mL of ConA or activated with MicroBeads at different T cell to MicroBead ratios. Cells were cultured in complete cell medium for 24 h. Afterwards, cells were washed in 1X annexin-binding buffer and resuspended at a density of 1×10^6 cells/mL. All of the reagents were prepared according to manufacturer's instructions. Five microliter of Annexin V-APC, 1 μ L of C12-resazurin-PE and 1 μ L of SYTOX™ Green working solution was added to each 100 μ L of cell suspension, followed by an incubation at 37°C (5% CO₂) for 15 min. Then cells were resuspended in 500 μ L of 1X annexin-binding buffer and analyzed within an hour after staining, using BD FACS Aria II flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Positive control for necrosis was prepared by incubating cells with 4mM hydrogen peroxide for 2 h at 37°C before staining. C12-resazurin was used to detect metabolically active cells. Non-fluorescent substrate was reduced by these cells to orange-fluorescent C12-resorufin. Cells positively stained by Annexin V were indicated as apoptotic, while SYTOX™ Green-positive cells as dead.

Cytokine Production Analysis

For cytokine production analysis PBLs were culture for 7 days and then re-stimulated for 4 h with 15 ng/ml Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) and 500 ng/ml Ionomycin (both from R&D systems, Minneapolis, MN) in the presence of Monensin (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). All were added per the manufacturer's instructions. After surface staining including rat anti-canine CD4-PE Cy7 (clone YKIX302.9) and rat anti-canine CD8 α -Alexa Fluor 647 (clone YCATE55.9) (both from Bio-Rad, Hercules, USA), intracellular staining for cytokines was performed using Fixation and Permeabilization buffers (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) according to the manufacturer's protocol. PBLs were fixed for 20 min in RT washed and resuspended in permeabilization buffer for 20 min followed by 30 min incubation with primary antibodies. For intracellular staining mouse anti-bovine IFN- γ -FITC antibody (clone CC302), with confirmed canine cross-reactivity was used, as well as polyclonal rabbit anti-canine IL-2 primary antibody followed by sheep anti-rabbit IgG PE conjugated secondary antibody staining (1:1,000 dilution) (all purchased from Bio-Rad, Hercules, USA). Afterwards, cells were washed with FACS buffer and analyzed using BD FACS Aria II flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

Western Blot Analysis

Total protein concentration in whole cell lysates obtained using RIPA (Radio-ImmunoPrecipitation Assay Buffer), supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail (Pierce™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), was determined using a BCA Protein Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Pierce™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Aliquots of cell extracts containing 20 μ g of protein were resolved through SDS-PAGE. The proteins were subsequently transferred to a nitrocellulose membrane (Pierce™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The membranes were

hybridized with appropriate primary antibody: rabbit monoclonal phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204), rabbit monoclonal p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5), rabbit monoclonal phospho-p70 S6 kinase (Thr389)(108D2), rabbit polyclonal p70 S6 kinase, rabbit monoclonal RSK1/RSK2/RSK3 (D7A2H), rabbit polyclonal phospho-Akt (S473), rabbit polyclonal Akt, rabbit monoclonal PI3 Kinase p110 δ (D1Q7R), rabbit monoclonal Histone H3 (3H1) and mouse monoclonal β -actin used as a loading control (Cell Signaling Technology, Danvers, USA). Detection of the specific proteins was performed directly on the nitrocellulose membranes using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Hercules, USA) and secondary antibody: donkey anti-rabbit IRDye 800 or donkey anti-mouse IRDye 680 (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

Statistical Analysis

Statistical analysis of data was performed using GraphPad PrismTM 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Comparisons between 2 groups were analyzed using a two-tailed Student's *t*-test with Welch's correction for parametric distribution or Mann-Whitney signed-rank test for nonparametric distribution. For comparisons between multiple groups, a One-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons *post-hoc* test or Two-way RM ANOVA was performed (as indicated in the figure legends). Symbols indicate a significant difference between the indicated groups, as follows: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

RESULTS

Nano-Sized Magnetic Beads Induce Immediate-Early Activation Responses in Dog T Cells

To elucidate whether the nano-sized magnetic beads coated with cross-linking antibodies of canine CD3 and CD28 (termed as MicroBeads) could activate canine PBLs, we first determined the early response of genes to T lymphocyte activation. We revealed increased expression of genes previously reported to be involved in immediate-early response in dogs and related to proliferation and cell cycle control (27). These included, prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*PTGS2*), V-FOS FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (*FOS*), growth arrest and DNA damage-inducible gene (*GADD45B*), early growth response 2 (*EGR2*) and regulator of G protein signaling (*RGS1*) (Figures 1A–E). We also investigated the expression of *CD69* (a membrane-bound, type II C-lectin receptor) classical early activation marker of lymphocytes in human and mice (29) and *CD25* (an α chain of receptor for IL-2) that is up-regulated in the late phase of activation (30). To define gene expression kinetics we collected cells 3, 6, and 24 h post activation. All genes increased significantly after 3 h post stimulation with either MicroBeads or ConA (Figures 1A–E). Interestingly, while *PTGS2*, *GADD45B*, *EGR2* and *RGS1* remained up-regulated after 6 h and returned to the base level of unstimulated cells with 24 h post stimulation, *FOS* decreased significantly in T cells activated with either MicroBeads or ConA upon 24 h of

stimulation in comparison to unstimulated cells. We also found that MicroBead-stimulated lymphocytes, similarly to ConA treated cells, exhibit significantly increased *CD69* and *CD25* levels after 3 and 6 h post activation in comparison to unstimulated cells (Figures 1F, G). The expression of *CD25* remained up-regulated even after 24 h (Figure 1G).

Canine T Lymphocytes are Effectively Activated by Nano-Sized Magnetic Beads

To determine the phenotype and activation status of canine PBLs, we next focused our interest on the surface expression of the activation marker *CD25* (α chain of IL-2R). We examined viable T lymphocytes upon 24 and 72 h of stimulation using MicroBeads or ConA. Above 75% of isolated cPBLs were *CD5*-positive (Figure 2A) with the mixture of *CD4*⁺ ($43 \pm 3.6\%$; mean $\pm$ SD) and *CD8*⁺ T lymphocytes ($18 \pm 4.4\%$) (Figure 2B). Surface staining of *CD25* revealed that ConA activate majority of *CD4*⁺ T cells ($96 \pm 2.7\%$), but fewer *CD8*⁺ T cells ($75 \pm 10.5\%$). While MicroBeads activate almost half of *CD4*⁺ T cells ($46 \pm 6.1\%$) and approximately 30% of *CD8*⁺ T cells 24 h post stimulation (Figures 2C–E). With time (72 h post stimulation), *CD25* slightly decreased on *CD8*⁺ T lymphocytes but remained elevated on *CD4*⁺ T cells (Figure 2D). Both MicroBeads and ConA stimulation induced significantly higher expression of activation marker (*p* < 0.001) in comparison to unstimulated cells.

In addition, we evaluated activation status based on phenotypic cells features. As expected, ConA as well as MicroBeads promotes blast cluster formation in the initial phase of activation. Microbeads caused T lymphocytes to form characteristic multiple aggregates, which is a hallmark of T cells activation, while unstimulated cells exhibit monolayer-like characteristics (Figure 2F). T cells stimulated *via* MicroBeads were bigger in size during blast transformation. In fact, the average size increased from $7.4 \pm 0.22\mu\text{m}$ (in unstimulated cells) to $10.4 \pm 0.8\mu\text{m}$ in MicroBead-activated lymphocytes, as determined using an automated cell counter and FSC-based flow cytometry analysis (Supplementary Figure 1).

By measuring *CD25* induction on canine T cells, we compared their activation status when stimulated with nano-sized magnetic beads (MicroBeads) versus stimulated with previously published paramagnetic Dynabeads (14, 15). Paramagnetic Dynabeads contain surface epoxy groups, are larger in size ($\sim 270\mu\text{m}$) and covalently bind primary amino and sulfhydryl groups in proteins and peptides, thus rendering them useful for coupling antibodies. We found that nano-sized MicroBeads induced *CD25* expression on canine T cells to the much higher extend than Dynabeads (Supplementary Figure 2). In our study we exploited nano-sized magnetic MicroBeads approach in more detail.

Activation Signal Strength Affects Canine T Cells Proliferation and Expansion

To evaluate the impact of activation signal strength on canine T lymphocytes expansion, we stimulated cells at either 1:2, 1:1, 1:0.5, 1:0.25 or a 1:0.125 of T cell to MicroBeads ratio (Figure 3A). We hypothesized that using more beads to T cells in the

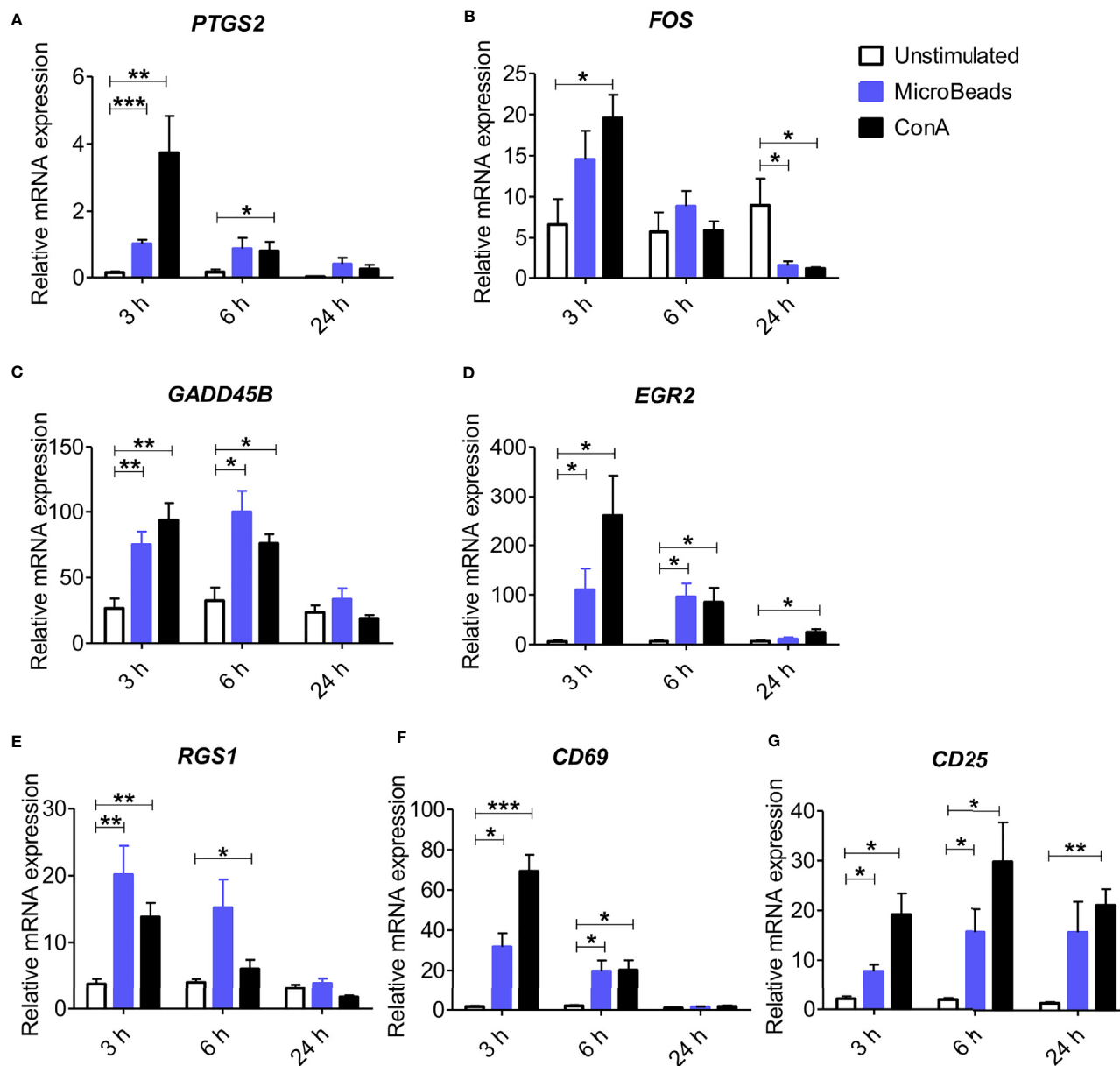


FIGURE 1 | Application of nano-sized magnetic beads coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies (MicroBeads) increases the expression of genes associated with early stages of activation determined by Real-time PCR. Bar graphs showing relative mRNA expression of *PTGS2* (A), *FOS* (B), *GADD45B* (C), *EGR2* (D), *RGS1* (E) *CD69* (F) and *CD25* (G) in unstimulated canine peripheral blood lymphocytes (PBLs) and after stimulation with MicroBeads (1:0.5 T cell: MicroBead ratio) and plant mitogen Concanavalin A (ConA). The analysis was performed using cells from 4 healthy dogs (n=4), in triplicates. Statistical analysis was performed by unpaired Student's *t*-test (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

culture would enhance their activation and expansion. To test this idea, we assayed T cells from their expression level of CD25 using flow cytometry. Interestingly, and in contrast to our hypothesis, we discovered that relatively low activation signal strength at the 1:0.5 and 1:0.25 ratio of T cell to MicroBeads was the most effective at inducing IL-2R α (CD25) expression in CD4 $^{+}$ T cells ($54 \pm 4.4\%$ and $44 \pm 6.1\%$ respectively) (Figures 3B, D). Furthermore, few MicroBeads concentration (1:0.5, 1:0.25

and 1:0.125 T cell:MicroBead ratio) were needed to activate CD8 $^{+}$ T cells with similar efficiency reaching approximately 40% (Figures 3C, D).

Next, we used CellTrace $^{\text{TM}}$ to determine T cell proliferation post MicroBeads activation at 2, 4, and 6 days post stimulation. Our study revealed that substantial proliferation rate of PBLs was achieved when 1:0.5 or 1:0.25 T cell:MicroBead ratio was used (Figures 4A–C). The percent of proliferating T cell were

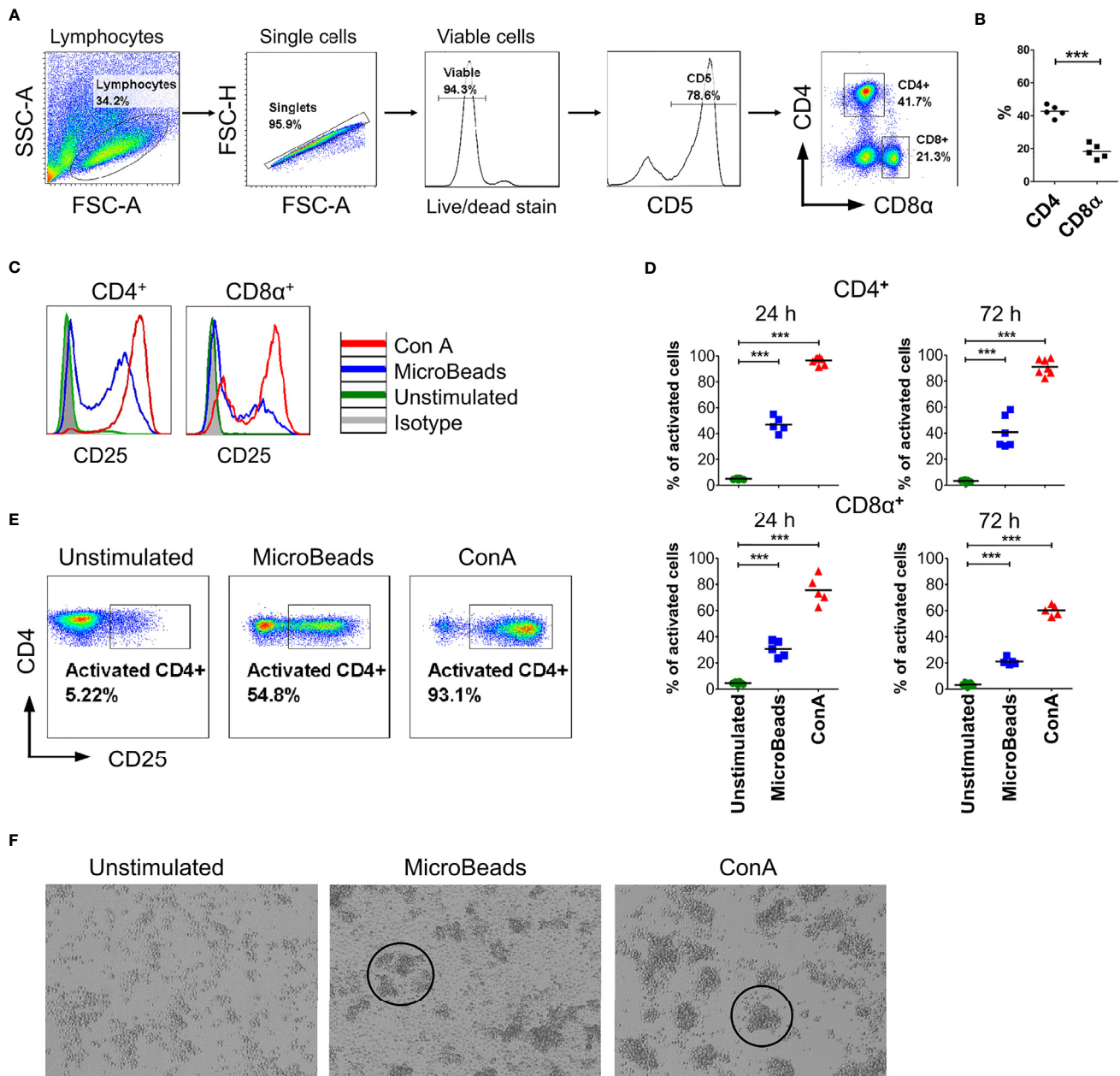


FIGURE 2 | Canine T lymphocytes are effectively activated using MicroBeads. Canine PBLs were analyzed by multicolor flow cytometry (FACS Aria II, Becton Dickinson). **(A)** Gating strategy for flow cytometry analysis. Viable lymphocytes were gated based on FSC and SSC scatter and Zombie dye-v500 staining after doublet-exclusion. Among CD5⁺ T cells two subpopulations were distinguished based on CD4 and CD8α expression. **(B)** Dot graph showing the percentage of CD4⁺ T cells and CD8α⁺ T cells. These two subpopulations were analyzed for activation marker (CD25) expression. Each dot represents one individual dog (n=5). **(C, E)** Representative histograms and cytograms of CD25 expression in unstimulated CD4⁺ and CD8α⁺ T lymphocytes and after stimulation with nano-sized magnetic beads coated with anti-canine CD3 and CD28 antibody (MicroBeads) and plant mitogen Concanavalin A (ConA). **(D)** Quantification of activated CD4⁺CD25⁺ and CD8α⁺CD25⁺ canine T cells 24 and 72 h post-stimulation with MicroBeads (1:1 T cell:MicroBead ratio) and ConA. Each dot represents one individual dog (n=5). Statistical analysis was performed by unpaired Student's *t*-test (****p* < 0.001). **(F)** Representative images from visualization of unstimulated PBLs and after stimulation with MicroBeads or ConA using BX60 microscope (Olympus Optical Co.) (magnify. x100). Canine T lymphocytes were effectively activated by MicroBeads and ConA as measured by blast cluster formation (marked in circles) in the initial phase of activation in contrast to unstimulated cells, which exhibit monolayer-like characteristic.

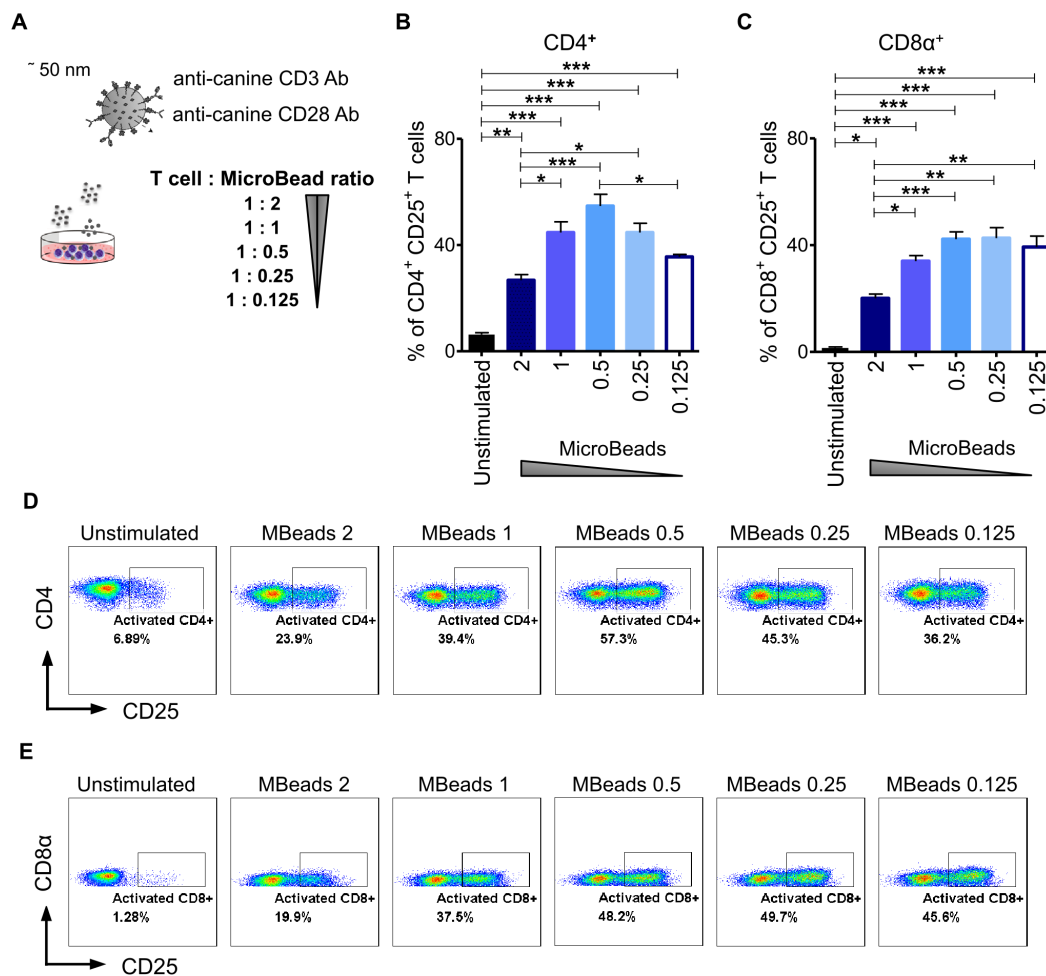


FIGURE 3 | Activation signal strength influence on the expression of CD25 in canine T lymphocyte. **(A)** The graphical scheme of experiment with application of different T cell to MicroBead ratios. Quantification of activated CD4⁺CD25⁺ **(B)** and CD8α⁺CD25⁺ **(C)** canine T cells depending on activation signal strength provided by different MicroBeads concentrations. Data are shown as the mean of five dogs (n=5), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by unpaired Student's *t*-test (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001). **(D, E)** Representative cytograms of CD25 expression in CD4⁺ and CD8α⁺ T lymphocytes after stimulation with different T cell to MicroBead ratios (FACS Aria II, Becton Dickinson).

47.6 ± 6.1% and 57.9 ± 5.8% at 1:0.5 and 1:0.25 T cell:MicroBead ratio respectively, on day 6 of the culture. Interestingly, at higher beads ratios, either a 1:2, 1:1 of T cell to MicroBeads, corresponding to stronger activation signal, we showed that canine T lymphocytes activation and proliferation was attenuated (**Figures 3, 4**). In addition, to assess cell expansion we counted cells every other day up to 14 days in total (**Figure 4D**). Cell expansion kinetics showed that canine T lymphocytes expanded similarly with ConA and MicroBeads (1:0.5 and 1:0.25 ratios). Moreover, after two weeks, only at 1:0.5 and 1:0.25 T cell:MicroBead ratios, did we find that canine T lymphocytes showed

highly significant increase in cell number fold change (*p* < 0.001) (**Figure 4D**).

Low or Long-Term High Temperature Impairs Canine T Lymphocytes Activation

Given that canine physiological body temperature varies between 38.3°C and 39.2°C, depending on the dog breed, we sought to next determine the optimal culturing condition of canine T cells in temperatures ranging from 33–41°C. We evaluated activation status in cells stimulated with MicroBeads and ConA for 24 and 72 h. As shown on **Figure 5**, only low temperature (33°C) impaired the

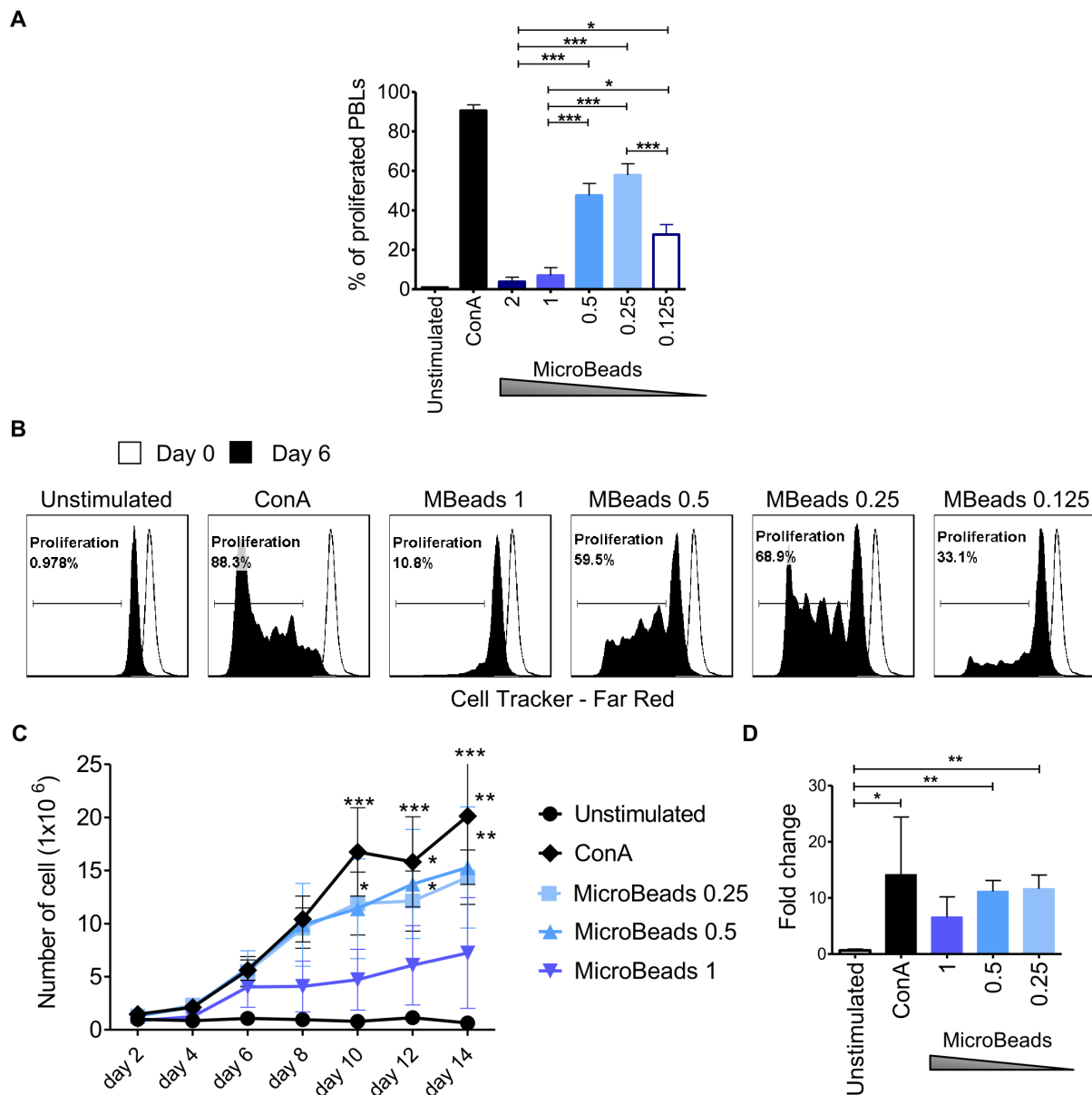


FIGURE 4 | Activation signal strength affects proliferation and expansion rate of canine lymphocyte. **(A)** Quantification of the percentage of canine PBLs proliferation under different activation conditions (T cell to MicroBead ratios as indicated) on day 6 of culture. Data are shown as the mean of three dogs ($n=3$), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test. **(B)** Representative histograms of PBLs stained with CellTrace™ Far Red, cultured with different Microbeads concentrations on day 6 of culture (FACS Aria II, Becton Dickinson). Histograms indicating the multiple peaks at successive generations of cPBLs divisions are shown. **(C)** Expansion kinetic for canine PBLs cultured using different activation signal strength provided by Microbeads and ConA. Data are shown as the mean of four dogs ($n=4$), and error bars indicate SEM. The number of viable cells was determining every other day for 14 days total using Countess II Automated Cell Counter and 4% Trypan blue. Statistical analysis was performed by Two-way RM ANOVA test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$). **(D)** Bar graph showing fold change of cPBLs number upon activation with ConA and different T cell to MicroBead ratios (as indicated) on day 14 of the culture. Data are shown as the mean of four dogs ($n=4$), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by unpaired Student's t -test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

activation of canine CD4⁺ T cells 24 and 72 h upon stimulation with either ConA or MicroBeads (Figure 5A). Likewise, when T cells were incubated at higher temperatures (40°C and 41°C) for 72 h, their activation was compromised based on reduced CD25

expression (Figure 5B). These results however, varied depending on the donor. Similar outcome was observed for CD8⁺ T cells (not shown). Overall, our studies revealed that the optimal temperatures for canine T lymphocytes culture was ~37–38.5°C, based on high

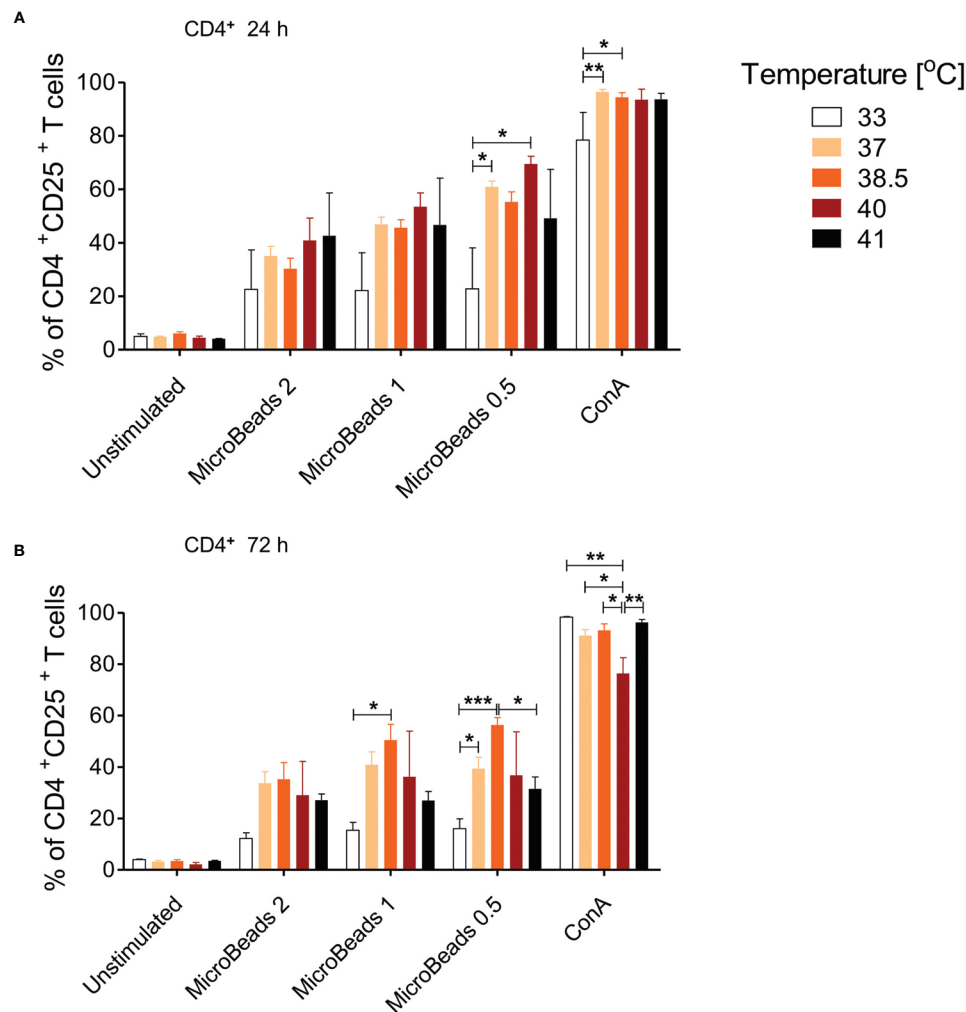


FIGURE 5 | The effect of culture temperature on activation of canine CD4⁺ T lymphocytes. Quantification of activated CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes after 24 h (**A**) and 72 h (**B**) post stimulation using different MicroBeads concentrations (as indicated) and ConA. To assess the impact of temperature PBLs were incubated in 33°C, 37°C, 38.5°C, 40°C or 41°C in humidified incubator, 5% CO₂ (Sanyo Electric). Data are shown as the mean of five dogs (n=5), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

CD25 expression. The presented data also revealed that lower signal strength (1:0.5 T cell:MicroBead ratio) induced greater activation of T cells, regardless of the culture temperature *in vitro* (**Figure 5**). For experiments henceforth, cPBLs were cultured at 38.5°C using low-strength activation signal beads (1:0.5 T cell:MicroBead ratio).

Nano-Sized Magnetic Beads-Based Stimulation Augments the Survival, Function, and Effector Memory Profile of Canine T Cells

We hypothesized that our optimized culture conditions would improve the survival of canine lymphocytes. Thus, we measured how different concentrations of MicroBeads impacted the viability of canine lymphocytes by measuring apoptosis after their activation. Importantly, we found that, in contrast to ConA-induced activation, canine lymphocytes were healthier

when expanded with our MicroBead-based stimulation approach, especially when lower T cell:MicroBead ratio was applied. Our apoptotic assay revealed similar level of apoptosis in 1:0.25 T cell:MicroBead ratio ($3.96 \pm 0.61\%$) in comparison to unstimulated cells ($3.95 \pm 1.92\%$) (**Figure 6A**). Statistical analysis did not show significant differences in the percentage of apoptotic cells upon activation with different concentration of MicroBeads. T cells stimulated with ConA had higher percentage of apoptotic ($13.14 \pm 8.53\%$) in comparison to unstimulated cells. There was no significance difference in percentage of dead cells between different types of activation. Moreover, the percentage of dead cells was low and did not exceed 1.21%. We also determined metabolic activity of PBLs based on reduction of non-fluorescent C12-resazurin into C12-resorufin. All PBLs presented high metabolic activity, without any significant differences between stimulation methods (**Figure 6A**).

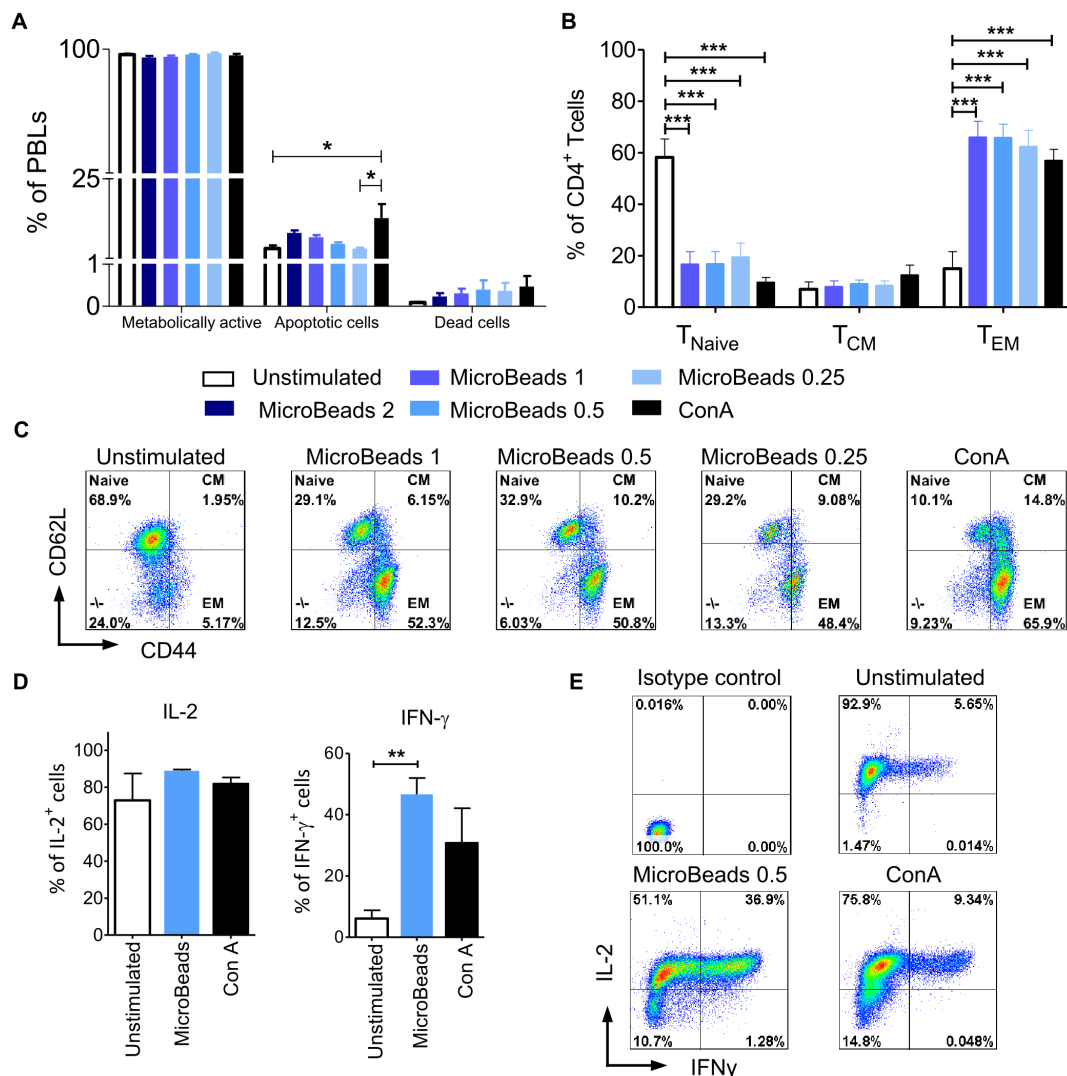


FIGURE 6 | MicroBeads-based stimulation does not increase activation induced cell death (AICD), induces T_{EM} phenotype and IFN-γ expression in canine T lymphocytes. **(A)** Bar graphs showing percentage of metabolically active cells (C12-resorufin⁺), apoptotic cells (Annexin V⁺) and dead cells (SYTOXTM Green⁺) upon stimulation with MicroBeads or ConA stained using the Metabolic Activity Dead Cell Apoptosis Kit. Data are shown as the mean of four dogs (n=4), and error bars indicate SEM. **(B)** Bar graph showing percentage of 1) naïve T cells (T_{Naive}, CD44^{low}CD62L^{high}); 2) central-memory T cells (T_{CM}, CD44^{high}CD62L^{high}) and 3) effector-memory T cells (T_{EM}, CD44^{high}CD62L^{low}) upon activation with MicroBeads or ConA after 20 days of culture. Data are shown as the mean of six dogs (n=6), and error bars indicate SEM. **(C)** Representative flow cytometry cytograms of different memory T CD4⁺ cells population stimulated with MicroBeads or ConA (FACS Aria II, Becton Dickinson). **(D, E)** Quantification and representative cytograms of IFN-γ and IL-2 expression in cPBLs activated with MicroBeads or ConA. Data are shown as the mean of three dogs (n=3), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test **(A, B)**, and unpaired Student's *t*-test **(D)** (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

Human and murine T cells acquire effector memory phenotype upon stimulation and expansion *ex vivo* (31). To determine memory profile of canine lymphocytes we exploited CD44/CD62L expression pattern, that was previously showed by Rothe et al. (32) to enable division of T cells into three populations: 1) naïve T cells (T_{Naive}, CD44^{low}CD62L^{high}); 2) central-memory T cells (T_{CM}, CD44^{high}CD62L^{high}) and 3) effector-memory T cells (T_{EM}, CD44^{high}CD62L^{low}). Analysis after 20 days of culture revealed that MicroBeads generated T

cells with an effector memory (T_{EM}) phenotype (up to 65% of cells) compared to unstimulated cells (**Figures 6B, C**).

Intracellular staining was used to assess the amount of effector cytokines: interferon-γ (IFN-γ) and IL-2, produced by cPBLs. Cytometric analysis showed that only MicroBead-activated T cells produced significantly more IFN-γ (*p* < 0.001) in comparison to unstimulated cells; 46.6 ± 5.4% in comparison to 6.1 ± 2.7%, respectively (**Figures 6D, E**). Interestingly, after activation with ConA and MicroBeads T cells produced

comparable high amount of IL-2 compared to unstimulated cells; $81.9 \pm 5.8\%$, $88.8 \pm 1.2\%$ and $72.8 \pm 14.6\%$, respectively (**Figures 6D, E**).

Nano-Sized Magnetic Beads Induce PI3K Signaling and Phosphorylation of p70 S6 Kinase

In order to evaluate the intracellular pathway induction by MicroBeads, we assessed the expression of proteins downstream of the mTORC1 pathway, including p70 S6 kinase [also known as ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1)]. MicroBeads as well as ConA induced the phosphorylation of p70 S6 kinase in cPBLs 1 h post activation (**Figure 7A**), which may lead to protein synthesis at ribosomes. We also investigated the expression of proteins involved in mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (such as ERK1/2 and RSK1/2/3). Phosphorylation of p44/42 MAPK (ERK1/2) kinase was increased by ConA treatment, but less by MicroBeads-based stimulation (**Figure 7B**). RSK1/2/3 was also upregulated 1 h post activation using CoA and MicroBeads in comparison to unstimulated cells (**Figure 7B**). Finally, we evaluated the expression Akt kinase 1 h post cPBLs stimulation and we found it was elevated in T cells stimulated with ConA and MicroBeads compared to unstimulated cells (**Figure 7C**). Also, we sought to investigate earlier time points and found significant phospho-Akt (S473) expression 15 min post activation using ConA and MicroBeads (**Figure 7D**). Interestingly, we also found that MicroBeads activation, but not ConA-based stimulation, induced the expression of PI3 kinase p110 δ subunit in canine T cells (**Figure 7D**).

DISCUSSION

Similar to humans, companion dogs develop a variety of different allergic and autoimmune diseases as well as different cancers types associated with immune system disorders. Therefore dog models offer multiple advantages in clinical research, ranging from the basic biology of the canine immune system to the evaluation of efficacy and safety of novel cellular immunotherapies in comparison to xenograph mouse model (reviewed in 19, 21, 22, 24, 33, 34). However, stimulation and expansion protocols of T lymphocytes in dogs are not as extensively investigated as in humans or mice systems. Herein, we provide comprehensive and insightful data concerning optimization of canine T lymphocytes activation and proliferation *in vitro*, in the context of activation signal strength and temperature, using antibody-coated nano-sized magnetic beads (MicroBeads). We also evaluated the beads-based expansion platform for the future use in basic and translational immunological studies.

Initially, canine T lymphocytes have been stimulated short-term *via* potent mitogens lectins, such as ConA (35, 36) and phytohemagglutinin (PHA) (37, 38) or longer-term using soluble or plate-bound anti-canine CD3 antibody alone (39–41) or in combination with CD28 antibody (6) along with IL-2 supplementation. However, naïve T lymphocytes require “two

signals” of activation provided solely by APCs. Therefore, in human immunological research T cells are expanded *ex vivo* using different types of APCs (42). Several expansion protocols for human T lymphocytes harness natural patients-derived dendritic cells (DCs) generated from peripheral blood monocytes. Other common approach is the use of human immortalized erythroleukemic K562 cells, which serve as artificial APCs (aAPCs) (42). The K562 cells express adhesion molecules that ensure immunological synapse formation and transduction of activation signal. Additionally, the K562 cells might be genetically engineered to express multiple co-stimulatory molecules and cytokines (43). Importantly, human T cells are also very efficiently and commonly expanded, in research and in clinical trials, using antibody-coated bead based DCs. This approach exploit paramagnetic or magnetic beads coated with CD3 and CD28 or other co-stimulatory agonistic antibodies (44–46).

In veterinary settings O'Connor and colleagues (13) were the first that took advantage of artificial APCs stimulation to expand canine T lymphocytes derived from peripheral blood of healthy donors and advance stage NHL-bearing dogs. Using γ -irradiated K562 cells expressing array of human co-stimulatory and adhesion molecules, loaded with anti-human CD3 (clone OKT3), they achieved the canine T cells propagation necessary for adoptive immunotherapy. Moreover, hrIL-21 along with hrIL-2 have been used to ensure selective canine CD8⁺ T cells proliferation. Adopting this method Mata et al. (47) established the canine PBMCs expansion procedure using, in addition to γ -irradiated K562 cells, the mitogen PHA (instead of OKT3) as well as hrIL-21, which resulted in approximately 100-fold expansion of lymphocytes within 2 weeks of culture *in vitro*. This method was further improved by Panjwani and co-workers (2016, 2019) (14, 15), who apart from using beads-based activation, employed also K562 cells transduced to express canine CD86 loaded with agonistic anti-canine CD3 antibody in the presence of cytokine regimen. These authors reported, to date, the largest expansion of T cells (more than 200-fold) derived from healthy companion dogs as well as from patients with refractory B cell lymphoma (14). While these methods are exciting and informative to the field, our work is the first to use nanoparticles to expand canine lymphocytes. Future experiments using IL-21 or other homeostatic cytokines shall be interesting to uncover the factors needed to bolster the generation of canine lymphocytes for clinical use.

Despite impressive efficiency of the K562 aAPCs-based expansion, this platform is like not ideal for wide used in veterinary adoptive immunotherapy in the clinic (42). This limitation is mainly due to the fact that K562 cells origin from human malignant tumor cells (43). Although K562 cells are irradiated prior to co-culture with PBMCs and were not detected upon T cells expansion (43), infusing them to canine patients might raise concerns. Even though K562 cells are not present in the transferred cells population, are harmless for the dogs, and they will meet all manufacturing practice requirements for clinical use, those cells still need irradiation. Such procedure might not be readily available in biomedical research facilities

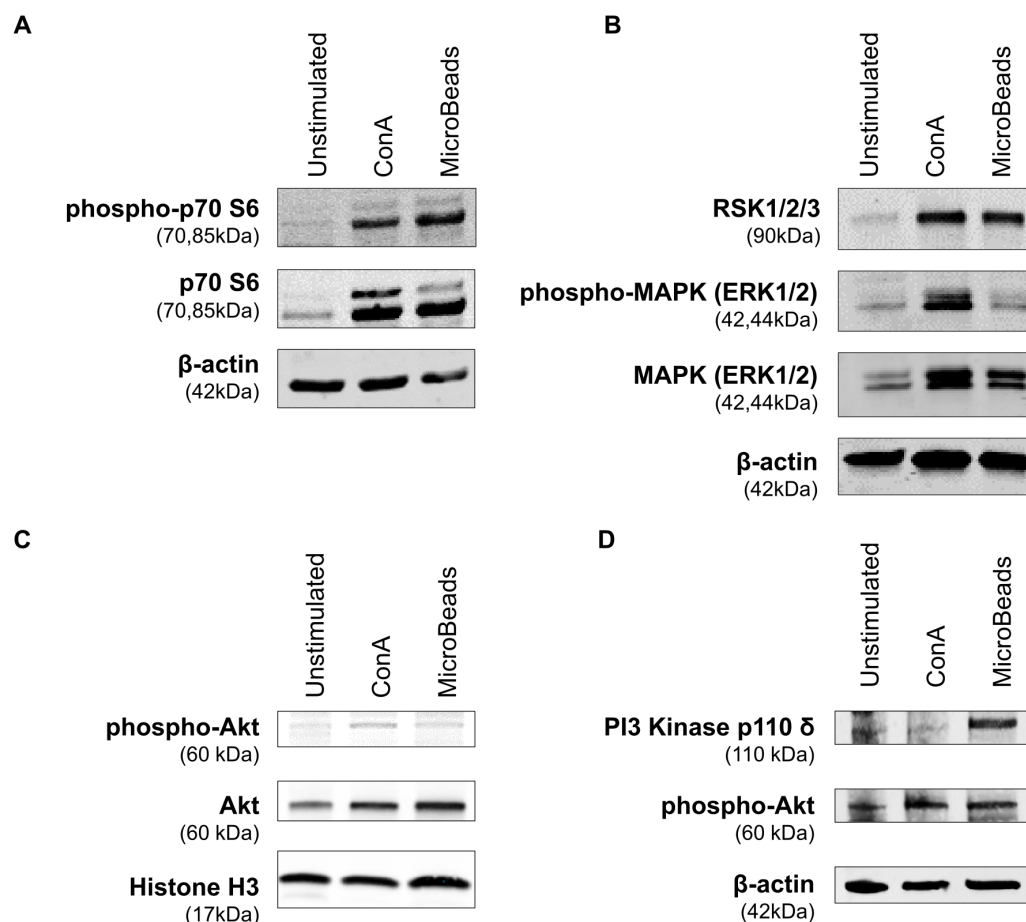


FIGURE 7 | Application of MicroBeads induce PI3K pathway. Western blot analysis of **(A)** phospho-p70 S6 Kinase, p70 S6 Kinase and β-actin (loading control) expression after 1h post stimulation with ConA or MicroBeads, **(B)** RSK1/2/3, phospho-MAPK (ERK1/2), MAPK (ERK1/2) and β-actin (loading control) expression after 1 h post stimulation with ConA or MicroBeads, **(C)** phospho-Akt, Akt and Histone-3 (loading control) expression after 1 h post stimulation with ConA or MicroBeads, **(D)** phospho-Akt, PI3 Kinase p110 δ and β-actin (loading control) expression after 15 min post stimulation with ConA or MicroBeads. Results from one experiment with no replicates are shown.

(48) and is unlikely to be used in veterinary clinics or laboratories. Hence our finding that nanoparticles can effectively expand and activate canine lymphocytes has far reaching and immediate implications in the clinic.

Indeed beads-based stimulation is far more accessible and affordable option for expansion of canine T lymphocytes for cellular immunotherapy in veterinary medicine. Research group of Mason and co-workers attempted to make use of anti-canine CD3/CD28 antibodies-coated magnetic Dynabeads (14, 15). They evaluated parallel impact of ConA, K562 aAPCs and beads-based stimulation on canine T cells activation and proliferation *in vitro*. While all three stimuli induced lymphocytes division by day six of culture, only K562-based aAPCs stimulation significantly foster the expansion of T cells from all donors. Beads-based stimulation works well in some donors, but fail in others (14). Interestingly, in subsequent

studies, lymphocytes activated with Dynabeads coated with CD3/CD28 antibodies were characterized by higher effectiveness of lentiviral transduction. Hence, there is a rationale for using this method in the development of CAR T cell therapy (15). Noteworthy, similar observations were made in human clinical trials, where some patient's T cells did not respond to signal provided by the beads (49). Nevertheless, the beads-based stimulation was not abandoned in human medicine. In fact, the beads-based system was shown to be feasible and reliable for FDA-approved clinical applications (44, 49). Therefore, activation platform based on magnetic beads need to be fine-tuned and more deeply investigated in veterinary settings. In our research, we discovered that nano-sized anti-canine CD3/CD28 magnetic beads activation supports proliferation and function of T lymphocytes of healthy donors. We were also the first to discover the optimal activation signal

strength. We revealed that relatively low signal strength (1:0.5 and 1:0.25 ratios of T cell to MicroBeads) is beneficial for CD4⁺ and CD8⁺ canine T cells proliferation and acquiring of effector phenotype, regardless of culture temperature.

Several studies suggest that optimizing the bead to T cell ratio should be considered while developing expansion protocols, in order to limit T cells anergy and preserve high cells viability as well as to reduce costs of T cells culture *ex vivo* (45, 46). We obtained optimal effects using relatively low signal strength provided by MicroBead-based stimulation. We speculate that the discrepancies between our results and those already reported (14) might be due to the use of lower T cell to beads ratio (1:3 T cells to beads ratio by Panjwani et al., 2016) and/or due to smaller size of beads exploited in our study. We applied the nano-sized beads (~50 nm diameter), which are around 90-times smaller than classical CD3/CD28 activation Dynabeads (4.5 µm diameter) and thus were suspected to be superior at expanding T cells *ex vivo* (42). These MicroBeads could better mimic immunological synapse and are found to be biodegradable. Moreover MicroBeads could be coated with different co-stimulatory molecules providing the most beneficial signal for desired T cell subpopulation e.g. the ICOS-mediated co-stimulation supports Th17 cells differentiation (50).

Moreover, our results concerning T cell to MicroBeads ratio are in agreement with a research conducted on human PBMCs, which revealed that fewer beads could be used to support antigen-specific T cells survival and proliferation (45, 46). Recently, Martkamchan et al. (45) defined and confirmed that the optimal human PBMCs to anti-CD3/CD28 beads ratio is 1:0.5. Under these conditions the expansion of more than 1,000-fold was achieved within 3 weeks of culture while preserving high cell viability (45). Importantly and similarly to our findings, the lower strength of the signal from beads stimulation led to the expansion of CD8⁺ T lymphocytes. Whereas increase in the signal strength supported CD4⁺ T lymphocytes proliferation. Our research confirmed that canine T lymphocytes react to various signal strength similarly to human T cells, a finding that has immediate implications in further immunological studies in the context of cancer and infectious disease.

It was established that human T cells "fitness" is shaped by activation signal strength and duration (51). Prolonged stimulation of an individual human Th1 cell with a high concentration of the anti-CD3 antibody increased level of anergy of these cells (52). Moreover, signal strength among others factors such as co-stimulatory molecules and cytokine cue, affect T cells differentiation (53, 54). Weak TCR signal promotes Th2 and Th17 response, whereas strong TCR signaling leads to Th1 predominance and is required for Tfh differentiation (53, 55). By using different beads concentrations, activation signal strength can be regulated. Therefore, the employment of MicroBead-based stimulation shall pave new ways for more detailed studies on the differentiation of canine T cells into various subpopulations.

To optimize the activation of canine T cells *in vitro*, we cultured cells in different temperatures ranging from 33–41°C. Cytometric analysis of CD25 marker expression showed that a high level of activated T lymphocytes was obtained by growing cells at 38.5°C,

which is a mean physiological body temperature in dogs (56). Culturing PBLs at 37°C or 40°C did not result in significant changes in CD25 expression in comparison to 38.5°C, suggesting that canine lymphocytes can be also cultured at these temperatures. Nevertheless, observations made during our study indicate that while culturing freshly isolated cells is possible at 37°C, T cells that had been subjected to freezing did not activate at this temperature (data not shown). At higher temperatures (40°C, 41°C) canine T cells have not expanded (data not shown), probably due to spontaneous apoptosis. We suspect that based on human data demonstrating that heat stress sensitizes T cells to Fas receptor-mediated apoptosis (57). However, it is necessary to perform further research to fully understand this phenomenon in dogs. In our study, canine T lymphocytes were grown with optimal efficacy at temperature ranging from 37–38.5°C. According to literature data, only Mata et al. (47), have cultured canine CAR modified T cells at higher (though physiological for dogs) temperature of 38.5°C for the use in adoptive cellular immunotherapy (47). Other studies on canine T cells cultured *in vitro* were carried out at a standard incubation temperature of 37°C (13, 15, 16, 36, 58), which we also found is optimal for immunological studies in dogs. Importantly our research, as well as others, on murine and humans T cells (59), revealed that low temperature of 33°C significantly impairs canine T cells activation.

Other elements controlling the expansion and differentiation of T lymphocytes after the recognition of a foreign antigen *in vivo* is the induction of apoptosis, a process referred to as activation-induced cell death (AICD) (60, 61). Mobilization of the TCR receptor provides a strong survival signal for T lymphocytes, but at the same time initiates a series of molecular processes leading to apoptosis. For example by induction of Fas surface death receptor (CD95) and its ligand (CD95L) expression, inhibition of the anti-apoptotic proteins activity and trigger a cascade of caspases (60, 61). We revealed that MicroBeads, contrary to ConA, do not increase apoptosis upon activation and preserve their metabolic activity. Presumably due to the fact that the magnetic beads provide CD28 mediated co-stimulation, which inhibit apoptosis in humans, mainly by activating the PI3K/Akt pathway and promoting anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-xL proteins expression (61, 62).

In studies on the human CD4⁺ T lymphocytes expansion, the advantage of magnetic beads activation over stimulation with only soluble anti-CD3 antibody was demonstrated, both in terms of proliferation rate and the production of cytokines such as IFN-γ and TNFα (24). Moreover, magnetic bead-based stimulation rather than soluble antibody-related activation is currently used in clinical trials for the expansion of tumor-specific CAR T cells (63). We were the first to demonstrate that activation of canine PBLs using MicroBeads not only induces effector memory phenotype of expanded T cells but also enhances production of IL-2 to the levels achieved using ConA and causes significantly greater release of IFN-γ. This function data is an important advantage in the propagation of T cells for clinical grade adoptive cell transfer for cancer and infectious disease.

Finally, we determined the intracellular signaling pathway induced by MicroBead-based stimulation. We found that, similarly to human study (64), MicroBeads induced

phosphorylation of downstream proteins of PI3K pathway, and p110 δ subunit of PI3 kinase. Mitogens such as ConA lead to activation of the ERK1 and ERK2, which then phosphorylate and activate downstream targets such as the ribosomal S6 kinases (RSKs). RSK family members are exclusively activated by the ERKs. ERK1/2 and RSK1/2 can also translocate into the nucleus where, they cause transcriptional activation of genes, including transcription factors that control the cell cycle, cell survival and/or cell differentiation (65). In contrast to ConA, which as expected led to significant MAPK pathway activation, stimulation with MicroBeads caused phosphorylation of ERK1/2 to much lower extent. However, MicroBeads activation induced phosphorylation of p70 S6 kinase (Thr389), which is required for the action of phosphoinositide 3-dependent protein kinase 1 (PDK1). The PDK1 has a crucial function in T cell activation by nucleating the assembly of a signaling complex in response to CD28 engagement (66).

In conclusion, our study reveals a novel methodology for the activation and expansion of canine PBLs. The ultimate goal of this innovative approach is to uncover basic immunological biology of T cells in domestic dogs and in the near future exploit it for adoptive cell transfer therapy research. Our culturing system enables the swift regulation of T cells activation signal strength, co-stimulatory mechanism and proliferation as well as functionality is a valuable tool for further investigations in the veterinary immunology field. Similarities in inducing intracellular signaling pathways further underscore the utility of companion dog model in comparative medicine. Our new MicroBead-based canine lymphocytes activation and expansion platform has the potential to benefit adoptive immunotherapy in dogs and facilitate the design of next-generation clinical trials in humans.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IS: elaboration of research concept and design, creation of scientific hypothesis and determination of research objectives, development of methodology, performing experiments (cPBMCs isolation, cell cultures, T cells activation and proliferation assay, cell expansion, RNA isolation and Real-time PCR analysis, flow cytometry analysis,

apoptosis assay, cytokine production and memory phenotype analysis), analysis of the obtained data (including statistical analysis), interpretation of the results, writing original draft, review and editing, figure preparation. MG and JB: development of methodology, performing experiments (cPBMCs isolation, cell cultures, T cells activation, Western blotting). AŁ: performing experiments (proliferation assay). The others are correct. MB: performing experiments (Real-time PCR, Western blotting). CP: supervision, writing original draft, review and editing. KM-K: conceptualization, formal analysis, funding acquisition, supervision, figure preparation, writing original draft, review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was financed by the grant No. POIR.04.04.00-00-3EE9/17-00 entitled “*Modification of signaling pathways of canine Th17 lymphocytes subset to improve adoptive cellular immunotherapy for humans*” carried out within the First TEAM programme of the Foundation for Polish Science co-financed by the European Union under the European Regional Development Fund, Smart Growth Operational Programme 2014-2020 (to KM-K).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.604066/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Activation with MicroBeads as well as ConA causes an increase in cell size during blast transformation. Representative flow cytometry cytograms (A) and histograms (B) indicating cell size based on FSC scatter. (C) Dot graph showing changes in size of T cells activated with MicroBeads and ConA. Data obtained using Countess II Automated Cell Counter. The average size increased from $7.4 \pm 0.22 \mu\text{m}$ in unstimulated cells to $10.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$ in MicroBeads activated lymphocytes. Data are shown as the mean of six dogs ($n=6$), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by unpaired Student's *t*-test ($***p < 0.001$).

Supplementary Figure 2 | Canine T lymphocytes activation efficiency after application of two types of beads (Dynabeads and MicroBeads 1:0.5) coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies. Dot graph showing the percentage of activated CD4⁺CD25⁺ (A) and CD8 α ⁺CD25⁺ (B) T cells. Each dot represents one individual dog ($n=4$). Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

REFERENCES

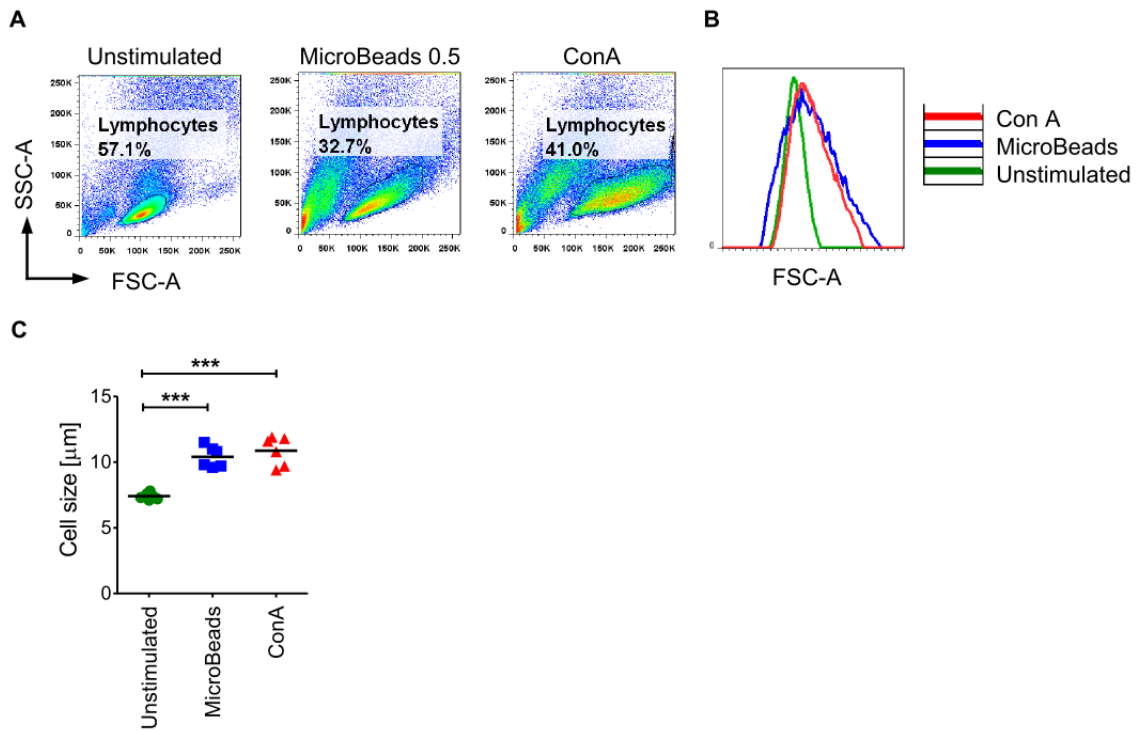
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol* (2009) 27:591–619. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706
- Wagner JL. Molecular Organization of the Canine Major Histocompatibility Complex. *J Hered* (2003) 94:23–6. doi: 10.1093/jhered/esg002
- Mielcarek M, Kucera KA, Nash R, Torok-Storb B, McKenna HJ. Identification and Characterization of Canine Dendritic Cells Generated In Vivo. *Biol Blood Marrow Transplant* (2007) 13:1286–93. doi: 10.1016/j.bbmt.2007.07.010
- Goral S. The three-signal hypothesis of lymphocyte activation/targets for immunosuppression. *Dialysis Transplant* (2011) 40:14–6. doi: 10.1002/dat.20527
- Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* (2013) 13:227–42. doi: 10.1038/nri3405
- Graves SS, Stone DM, Loretz C, Peterson LJ, Lesnikova M, Hwang B, et al. Antagonistic and agonistic anti-canine CD28 monoclonal antibodies: tools for allogeneic transplantation. *Transplantation* (2011) 91:833–40. doi: 10.1097/TP.0b013e31820f07ff

7. Habib-Agahi M, Phan TT, Searle PF. Co-stimulation with 4-1BB ligand allows extended T-cell proliferation, synergizes with CD80/CD86 and can reactivate anergic T cells. *Int Immunol* (2007) 19:1383–94. doi: 10.1093/intimm/idx106
8. Sato M, Storb R, Loretz C, Stone D, Mielcarek M, Sale GE, et al. Inducible costimulator (ICOS) up-regulation on activated T cells in chronic graft-versus-host disease after dog leukocyte antigen-nonidentical hematopoietic cell transplantation: a potential therapeutic target. *Transplantation* (2013) 96:34–41. doi: 10.1097/TP.0b013e318295c025
9. Mueller D, Jenkins M. Molecular mechanisms underlying function T-cell unresponsiveness. *Curr Opin Immunol* (1995) 7:375–81. doi: 10.1016/0952-7915(95)80113-8
10. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* (2015) 348:62–8. doi: 10.1126/science.aaa4967
11. Tran E, Ahmadzadeh M, Lu Y-C, Gros A, Turcotte S, Robbins PF, et al. Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science* (2015) 350:1387–90. doi: 10.1126/science.aad1253
12. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu Y-C, Dudley ME, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* (2014) 344:641–5. doi: 10.1126/science.1251102
13. O'Connor CM, Sheppard S, Hartline CA, Huls H, Johnson M, Palla SL, et al. Adoptive T-cell therapy improves treatment of canine non-Hodgkin lymphoma post chemotherapy. *Sci Rep* (2012) 2:249. doi: 10.1038/srep00249
14. Panjwani MK, Smith JB, Schutsky K, Gnanandarajah J, O'Connor CM, Powell DJ, et al. Feasibility and Safety of RNA-transfected CD20-specific Chimeric Antigen Receptor T Cells in Dogs with Spontaneous B Cell Lymphoma. *Mol Ther* (2016) 24:1602–14. doi: 10.1038/mt.2016.146
15. Panjwani MK, Atherton MJ, MaloneyHuss MA, Haran KP, Xiong A, Gupta M, et al. Establishing a model system for evaluating CAR T cell therapy using dogs with spontaneous diffuse large B cell lymphoma. *Oncoimmunology* (2019) 9:1676615. doi: 10.1080/2162402X.2019.1676615
16. Sakai O, Igase M, Mizuno T. Optimization of canine CD20 chimeric antigen receptor T cell manufacturing and in vitro cytotoxic activity against B-cell lymphoma. *Vet Comp Oncol* (2020) 18(4):739–52. doi: 10.1111/vco.12602
17. Department of Health and Human Services. *Canine Immunotherapy Trials and Correlative Studies (U01)*. Grants & Funding National Institutes of Health (NIH) (2017). Available at: <https://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-CA-17-001.html> (Accessed September 1, 2020).
18. Bujak JK, Pingwara R, Nelson MH, Majchrzak K. Adoptive cell transfer: new perspective treatment in veterinary oncology. *Acta Vet Scand* (2018) 60:60. doi: 10.1186/s13028-018-0414-4
19. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* (2008) 8:147. doi: 10.1038/nrc2273
20. LeBlanc AK, Breen M, Choyke P, Dewhirst M, Fan TM, Gustafson DL, et al. Perspectives from man's best friend: National Academy of Medicine's Workshop on Comparative Oncology. *Sci Transl Med* (2016) 8:324ps5. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf0746
21. Gordon I, Paoloni M, Mazcko C, Khanna C. The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. *PLoS Med* (2009) 6:e1000161. doi: 10.1371/journal.pmed.1000161
22. Klingemann H. Immunotherapy for Dogs: Running Behind Humans. *Front Immunol* (2018) 9:133. doi: 10.3389/fimmu.2018.00133
23. Bachmann MF, Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep* (2007) 8:1142–8. doi: 10.1038/sj.embor.7401099
24. Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J Transl Med* (2010) 8:104. doi: 10.1186/1479-5876-8-104
25. Perica K, De León Medero A, Durai M, Chiu YL, Bieler JG, Sibener L, et al. Nanoscale artificial antigen presenting cells for T cell immunotherapy. *Nanomedicine* (2014) 10:119–29. doi: 10.1016/j.nano.2013.06.015
26. Perica K, Tu A, Richter A, Bieler JG, Edidin M, Schneck JP. Magnetic field-induced T cell receptor clustering by nanoparticles enhances T cell activation and stimulates antitumor activity. *ACS Nano* (2014) 8:2252–60. doi: 10.1021/nn405520d
27. Mortlock S-A, Wei J, Williamson P. T-cell activation and early gene response in dogs. *PLoS One* (2015) 10:e0121169. doi: 10.1371/journal.pone.0121169
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (2001) 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
29. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* (1994) 15:479–83. doi: 10.1016/0167-5699(94)90193-7
30. Shatrova AN, Mityushova EV, Vassilieva IO, Aksenov ND, Zenin VV, Nikolsky NN, et al. Time-Dependent Regulation of IL-2R α -Chain (CD25) Expression by TCR Signal Strength and IL-2-Induced STAT5 Signaling in Activated Human Blood T Lymphocytes. *PLoS One* (2016) 11:e0167215. doi: 10.1371/journal.pone.0167215
31. Cui W, Kaech SM. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev* (2010) 236:151–66. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00926.x
32. Rothe K, Bismarck D, Büttner M, Alber G, von Buttlar H. Canine peripheral blood CD4+CD8+ double-positive Tcell subpopulations exhibit distinct Tcell phenotypes and effector functions. *Vet Immunol Immunopathol* (2017) 185:48–56. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.01.005
33. LeBlanc AK, Mazcko CN, Khanna C. Defining the value of a comparative approach to cancer drug development. *Clin Cancer Res* (2016) 22(9):2133–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2347
34. Rasmussen AM, Borelli G, Hoel HJ, Lislud K, Gaudernack G, Kvalheim G. Ex vivo expansion protocol for human tumor specific T cells for adoptive T cell therapy. *J Immunol Methods* (2010) 355:52–60. doi: 10.1016/j.jim.2010.02.004
35. Hartley AN, Tarleton RL. Chemokine receptor 7 (CCR7)-expression and IFN γ production define vaccine-specific canine T-cell subsets. *Vet Immunol Immunopathol* (2015) 164:127–36. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.02.001
36. Kato M. A novel culture method of canine peripheral blood lymphocytes with concanavalin A and recombinant human interleukin-2 for adoptive immunotherapy. *J Vet Med Sci* (2007) 69:481–6. doi: 10.1292/jvms.69.481
37. Shelton GD, Fujii Y, Lindstrom J. Mitogen stimulation of canine normal and myasthenia gravis lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* (1990) 24:1–9. doi: 10.1016/0165-2427(90)90073-2
38. Mizuno S, Fujinaga T, Kurosawa T. Augmentative effects of phytohemagglutinin-P on proliferation and cytotoxicity of interleukin-2-activated canine peripheral blood lymphocytes. *Zentralbl Veterinarmed A* (1996) 43:289–96. doi: 10.1111/j.1439-0442.1996.tb00455.x
39. Itoh H, Kakuta T, Kudo T, Sakonju I, Hohdatsu T, Ebina T, et al. Bulk cultures of canine peripheral blood lymphocytes with solid phase anti-CD3 antibody and recombinant interleukin-2 for use in immunotherapy. *J Vet Med Sci* (2003) 65:329–33. doi: 10.1292/jvms.65.329
40. Hoshino Y, Takagi S, Osaki T, Okumura M, Fujinaga T. Phenotypic analysis and effects of sequential administration of activated canine lymphocytes on healthy beagles. *J Vet Med Sci* (2008) 70:581–8. doi: 10.1292/jvms.70.581
41. Bae S, Kim K, Oh T. The effect of an ex vivo boosted immune cell therapy on canine atopic dermatitis: an open, uncontrolled pilot study. *Vet Dermatol* (2018) 29:504–e169. doi: 10.1111/vde.12687
42. Neal LR, Bailey SR, Wyatt MM, Bowers JS, Majchrzak K, Nelson MH, et al. The Basics of Artificial Antigen Presenting Cells in T Cell-Based Cancer Immunotherapies. *J Immunol Res Ther* (2017) 2:68–79.
43. Butler MO, Hirano N. Human cell-based artificial antigen-presenting cells for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* (2014) 257:191–209. doi: 10.1111/imr.12129
44. Oelke M, Krueger C, Giuntoli RL, Schneck JP. Artificial antigen-presenting cells: artificial solutions for real diseases. *Trends Mol Med* (2005) 11:412–20. doi: 10.1016/j.molmed.2005.07.005
45. Martkamchan S, Onlamoon N, Wang S, Pattanapanyasat K, Ammaranon P. The Effects of Anti-CD3/CD28 Coated Beads and IL-2 on Expanded T Cell for Immunotherapy. *Adv Clin Exp Med* (2016) 25:821–8. doi: 10.17219/acem/35771
46. Kalamasz D, Long SA, Taniguchi R, Buckner JH, Berenson RJ, Bonyhadi M. Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies. *J Immunother* (2004) 27:405–18. doi: 10.1097/00002371-200409000-00010

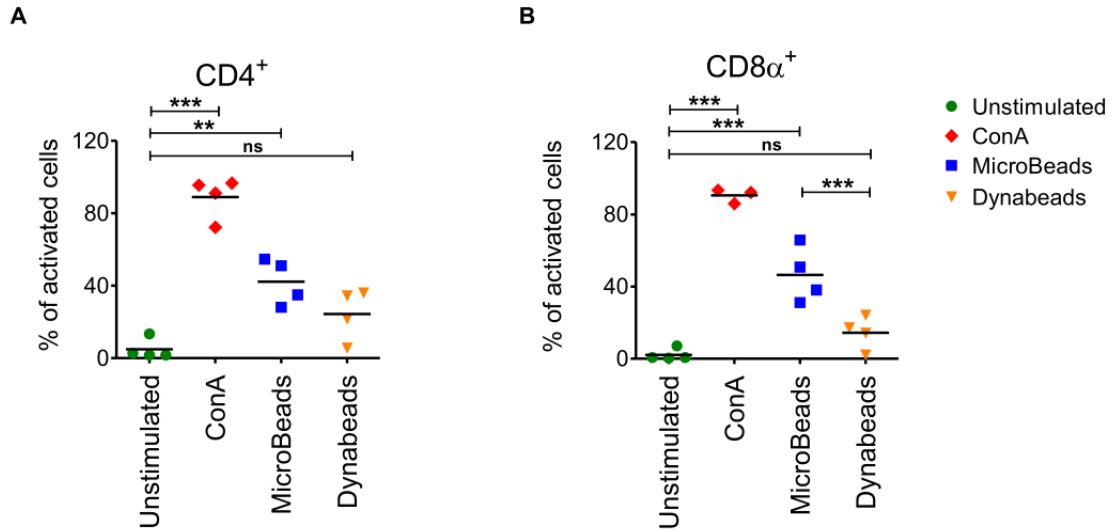
47. Mata M, Vera JF, Gerken C, Rooney CM, Miller T, Pfent C, et al. Toward immunotherapy with redirected T cells in a large animal model: ex vivo activation, expansion, and genetic modification of canine T cells. *J Immunother* (2014) 37:407–15. doi: 10.1097/CJI.0000000000000052
48. Carr WH, Zinsou C, Rowe T, Lange C, Lawal OO eds. Human natural killer cell expansion in vitro using mitomycin-C treatment as an alternative to irradiation of modified K562 feeder cells. *J Immunol May* (2017) 198(1):82.16.
49. Porter DL, Hwang W-T, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med* (2015) 7:303ra139. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415
50. Paulos CM, Carpenito C, Plesa G, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Golovina TN, et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Sci Transl Med* (2010) 2:55ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.3000448
51. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* (2003) 4:355–60. doi: 10.1038/ni908
52. Yamamoto T, Hattori M, Yoshida T. Induction of T-cell activation or anergy determined by the combination of intensity and duration of T-cell receptor stimulation, and sequential induction in an individual cell. *Immunology* (2007) 121:383–91. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02586.x
53. van Panhuys N. TCR Signal Strength Alters T-DC Activation and Interaction Times and Directs the Outcome of Differentiation. *Front Immunol* (2016) 7:6. doi: 10.3389/fimmu.2016.00006
54. Snook JP, Kim C, Williams MA. TCR signal strength controls the differentiation of CD4+ effector and memory T cells. *Sci Immunol* (2018) 3:1–27. doi: 10.1126/sciimmunol.aas9103
55. Purvis HA, Stoop JN, Mann J, Woods S, Kozijn AE, Hambleton S, et al. Low-strength T-cell activation promotes Th17 responses. *Blood* (2010) 116:4829–37. doi: 10.1182/blood-2010-03-272153
56. Kreissl H, Neiger R. Measurement of body temperature in 300 dogs with a novel noncontact infrared thermometer on the cornea in comparison to a standard rectal digital thermometer. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* (2015) 25:372–8. doi: 10.1111/vec.12302
57. Tran SE, Meinander A, Holmström TH, Rivero-Muller A, Heiskanen KM, Linnau EK, et al. Heat stress downregulates FLIP and sensitizes cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* (2003) 10:1137–47. doi: 10.1038/sj.cdd.4401278
58. Yin Y, Boesteanu AC, Binder ZA, Xu C, Reid RA, Rodriguez JL, et al. Checkpoint Blockade Reverses Anergy in IL-13Rα2 Humanized scFv-Based CAR T Cells to Treat Murine and Canine Gliomas. *Mol Ther Oncolytics* (2018) 11:20–38. doi: 10.1016/j.omto.2018.08.002
59. Mace TA. Differentiation of CD8+ T cells into effector cells is enhanced by physiological range hyperthermia. *J Leukoc Biol* (2011) 90:951–62. doi: 10.1189/jlb.0511229
60. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* (2003) 193:70–81. doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00051.x
61. Sikora E. Activation-induced and damage-induced cell death in aging human T cells. *Mech Ageing Dev* (2015) 151:85–92. doi: 10.1016/j.mad.2015.03.011
62. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* (1995) 3:87–98. doi: 10.1016/1074-7613(95)90161-2
63. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics* (2016) 3:16015. doi: 10.1038/mto.2016.15
64. Hwang J-R, Byeon Y, Kim D, Park S-G. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Exp Mol Med* (2020) 52:750–61. doi: 10.1038/s12276-020-0435-8
65. Yasuda T, Kurosaki T. Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals. *Cell Cycle* (2008) 7:3634–40. doi: 10.4161/cc.7.23.7103
66. Park S-G, Schulze-Luehrman J, Hayden MS, Hashimoto N, Ogawa W, Kasuga M, et al. The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells. *Nat Immunol* (2009) 10:158–66. doi: 10.1038/ni.1687

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Szopa, Granica, Bujak, Łabędź, Błaszczyk, Paulos and Majchrzak-Kuligowska. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplementary Figure 1 | Activation with MicroBeads as well as ConA causes an increase in cell size during blast transformation. Representative flow cytometry cytograms **(A)** and histograms **(B)** indicating cell size based on FSC scatter. **(C)** Dot graph showing changes in size of T cells activated with MicroBeads and ConA. Data obtained using Countess II Automated Cell Counter. The average size increased from $7.4 \pm 0.22\mu\text{m}$ in unstimulated cells to $10.4 \pm 0.8\mu\text{m}$ in MicroBeads activated lymphocytes. Data are shown as the mean of six dogs ($n=6$), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by unpaired Student's t -test ($***p < 0.001$).



Supplementary Figure 2 | Canine T lymphocytes activation efficiency after application of two types of beads (Dynabeads and MicroBeads 1:0.5) coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies. Dot graph showing the percentage of activated CD4⁺CD25⁺ (**A**) and CD8 α ⁺CD25⁺ (**B**) T cells. Each dot represents one individual dog (n=4). Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Warszawa, 1.10.2025 r.

mgr inż. Iwona Szopa
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

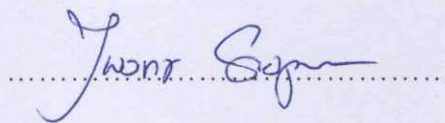
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Granica M, Bujak JK, Łabędź A, Błaszczuk M, Paulos CM, Majchrzak-Kuligowska K: Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach, *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i projektu badań, sformułowaniu hipotezy naukowej oraz określeniu celów badawczych, opracowaniu metodyki, wykonaniu doświadczeń (izolacja PBMC, hodowle komórkowe, aktywacja limfocytów T, analiza ekspresji genów metodą Real-time PCR, analiza komórek metodą cytometrii przepływowej: analiza poziomu cząsteczki CD25, proliferacji komórek, apoptozy, analiza syntezy cytokin oraz fenotypu komórek pamięci; analiza ekspansji limfocytów T), analizie statystycznej uzyskanych danych, przygotowaniu rycin, interpretacji wyników, opracowaniu tekstu publikacji oraz udzieleniu odpowiedzi na recenzje.



Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

mgr Monika Taşdemir
Szkoła Doktorska
Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Granica M, Bujak JK, Łabędź A, Błaszczak M, Paulos CM, Majchrzak-Kuligowska K: Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach, *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestnictwie w opracowaniu metodyki oraz przeprowadzeniu doświadczeń (izolacja PBMC, hodowle komórkowe, aktywacja limfocytów T, analiza metodą Western blot).

.....
Taşdemir

Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

Dr Joanna Bujak
Katedra Fizyki i Biofizyki
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Rada Dyscypliny Weterynaria

Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Granica M, Bujak JK, Łabędź A, Błaszczuk M, Paulos CM, Majchrzak-Kuligowska K: Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach, *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestnictwie w opracowaniu metodyki oraz przeprowadzeniu doświadczeń (izolacja PBMC, hodowle komórkowe, aktywacja limfocytów T, analiza metodą Western blot).

.....Joanna Bujak.....

Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

Dr Agata Łabędź
Międzynarodowe Centrum Badań Oka (ICTER)
Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk

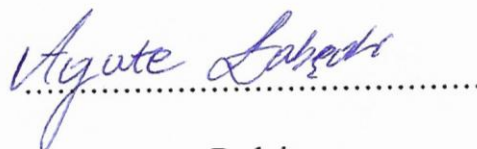
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Granica M, Bujak JK, Łabędź A, Błaszczyk M, Paulos CM, Majchrzak-Kuligowska K: Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach, *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestnictwie w przeprowadzeniu doświadczeń (analiza proliferacji komórek metodą cytometrii przepływowej).



Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

Dr Maciej Błaszczuk
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

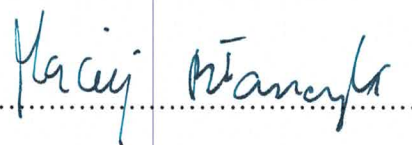
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Granica M, Bujak JK, Łabędź A, Błaszczuk, Paulos CM, Majchrzak-Kuligowska K:
Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized
Magnetic Beads Approach, *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestnictwie w przeprowadzeniu
doświadczeń (analiza ekspresji genów metodą Real-time PCR, analiza metodą Western blot).

A handwritten signature in blue ink, reading "Maciej Błaszczuk", written over a horizontal dotted line.

Podpis

Warsaw, 1.10.2025 r.

Chrystal M. Paulos, PhD
Department of Microbiology and Immunology
Emory University
Atlanta, GA, USA

Veterinary Discipline Council
Warsaw University of Life
Sciences (SGGW)

Statement of author contributions

I hereby declare that in the article:

Szopa IM, Granica M, Bujak JK, Łabędź A, Błaszczuk M, Paulos CM, Majchrzak-Kuligowska K: Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach, *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066

My individual contribution consisted of research supervision, as well as writing, review and editing of the manuscript.



.....

Signature

Warszawa, 1.10.2025 r.

Dr hab. Kinga Majchrzak-Kuligowska
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Rada Dyscypliny Weterynaria

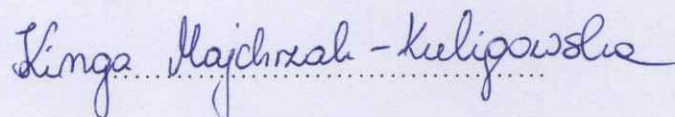
**Szkoły Główniej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Granica M, Bujak JK, Łabędź A, Błaszczuk M, Paulos CM, Majchrzak-Kuligowska K: Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach, *Frontiers in Immunology*, 2021, 12:604066

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i projektu badań, pozyskaniu finansowania, opiece merytorycznej i kierowaniu projektem, przygotowaniu rycin, opracowaniu tekstu publikacji oraz udzieleniu odpowiedzi na recenzje.



Podpis



Article

A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity

Iwona Monika Szopa ^{1,*} , Kinga Majchrzak-Kuligowska ¹, Rafał Pingwara ¹ , Marek Kulka ²,
Monika Taşdemir ^{3,4} and Małgorzata Gajewska ¹

¹ Department of Physiological Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-776 Warsaw, Poland; kinga_majchrzak@sggw.edu.pl (K.M.-K.); rafal_pingwara@sggw.edu.pl (R.P.); malgorzata_gajewska@sggw.edu.pl (M.G.)

² Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-776 Warsaw, Poland; marek_kulka@sggw.edu.pl

³ Department of Immunology, Medical University of Warsaw, 02-097 Warsaw, Poland; monika.granica@wp.pl

⁴ Doctoral School, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland

* Correspondence: iwona_szopa@sggw.edu.pl

Abstract: Th17 lymphocytes are a distinct subpopulation of T cells that are characterized by the production of interleukins IL-17, IL-21, IL-22, and IL-26, and high expression of ROR γ t. These cells play an important role in inflammation and autoimmune diseases. Recent studies using rodent and human models have also highlighted their promising properties as agents in cellular immunotherapy for cancer. However, much less is known about the properties of canine Th17 lymphocytes, despite the domestic dog being an important model used in comparative medicine. In this study, we developed methods of activation and differentiation of canine CD4⁺ T lymphocytes towards the Th17 phenotype. Additionally, we targeted the Wnt/ β -catenin signaling pathway to modulate the efficiency of Th17 cells differentiation. CD4⁺ T cells were successfully activated with magnetic EpoxyBeads, and in combination with the appropriate programming medium, they acquired the Th17 phenotype. Furthermore, indomethacin, an inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway, significantly increased the efficiency of differentiation, causing elevated production of IL-17 and changed T cell metabolism by promoting oxidative phosphorylation. The protocol elaborated in our study provides an efficient method of canine Th17 lymphocyte differentiation. Our findings also suggested that the modification of the Wnt/ β -catenin signaling pathway could be a valuable strategy for optimizing canine Th17 cell differentiation and advancing cell-based immunotherapy.

Keywords: Th17 lymphocytes; T cell activation; magnetic EpoxyBeads; Wnt/ β -catenin signaling pathway; memory phenotype; T cell metabolism; interleukin-17; domestic dog model



Academic Editor: Špela Konjar

Received: 20 March 2025

Revised: 15 May 2025

Accepted: 19 May 2025

Published: 21 May 2025

Citation: Szopa, I.M.; Majchrzak-Kuligowska, K.; Pingwara, R.; Kulka, M.; Taşdemir, M.; Gajewska, M. A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26*, 4946. <https://doi.org/10.3390/ijms26104946>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Th17 cells are the subset of effector T helper lymphocytes identified over a decade ago as interleukin 17 (IL-17)-producing T cells that regulate tissue inflammation [1]. This specific subset of T helper lymphocytes is determined by their ability to produce IL-17, IL-22, IL-21, IL-26, and CC chemokine ligand 20 (CCL-20) [2]. Th17 cells also express retinoic acid-related orphan receptor gamma t (ROR γ t) [3]. The exact role of these cells in many physiological

processes remains ambiguous, but studies have shown the involvement of Th17 cells in the course of various diseases in both humans and dogs [3–5]. The main function of Th17 lymphocytes is to participate in host defensive mechanisms against extracellular pathogens during infections [6,7]. Moreover, the effector cytokines produced by Th17 cells are associated with the pathogenesis of human autoimmune diseases, such as multiple sclerosis [8], rheumatoid arthritis [9], inflammatory bowel disease [10], systemic lupus erythematosus [11,12], psoriasis [13], and asthma [14]. Much less is known about the role of Th17 cells in the pathogenesis of the autoimmune diseases in dogs; however, the implication of Th17 lymphocytes has been described in the development of canine atopic dermatitis [15,16], steroid responsive meningitis-arteritis [17], and meningoencephalomyelitis [18].

Interestingly, recent studies have demonstrated that subpopulation of the Th17 lymphocytes is a promising agent in adoptive cellular immunotherapy (ACT) for cancer treatment. Adoptively transferred Th17-polarized cells exhibit a superior ability to eradicate cancer in a mouse melanoma model, compared to Th1 and Th2 cells [19–22]. Additionally, Th17 cells show a therapeutic ability to mediate durable tumor immunity and protect mice from tumor rechallenge, including lung metastasis [23]. These promising characteristics are caused by their stem cell-like properties and resistance to apoptosis, allowing the Th17 lymphocytes to maintain the potent antitumor activity after long-term ex vivo expansion [23,24].

Th17 cells, similarly to Th1 and Th2 lymphocytes, require a specific cytokine milieu for their differentiation [25]. Cytokine requirements differ slightly for mouse and human Th17 lymphocytes. However, the most important cytokine known to be involved in the induction of Th17 cell differentiation in both species is TGF- β [26]. At the initial stage of polarization, mouse T cells not only require the presence of TGF- β but also IL-6. IL-21 is then required as a cytokine that enhances the expansion of mouse Th17 lymphocytes [3,27]. To induce human Th17 differentiation, a combination of TGF- β and IL-21 is sufficient, and IL-1 β and IL-6 are crucial for promoting their further proliferation [28]. The final stage of lymphocyte differentiation is the maintenance of their phenotype. The stabilization of mouse and human Th17 cells is mediated by IL-23 [3,29]. Although earlier stages of differentiation do not require IL-23, this cytokine promotes further proliferation, survival and stability of Th17 cell characteristics. Therefore, IL-23 is also crucial for Th17 differentiation in long-term in vitro cultures [30].

A crucial signaling pathway in cell differentiation during both embryonic and post-natal development is the Wnt/ β -catenin signaling pathway [31]. Significant efforts have been made to understand the role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, as it is known to regulate various crucial cellular functions in both thymic T cell development and mature peripheral T cell differentiation. Research has demonstrated that the activation of this signaling pathway in peripheral T cells can suppress their differentiation into effector cells. This effect is linked to suppressed cell division and a reduced ability to acquire effector functions, indicating that Wnt/ β -catenin signaling acts as a negative regulator of effector T cell differentiation [32,33]. Moreover, the Wnt/ β -catenin signaling pathway has been shown to promote self-renewal and multipotency of hematopoietic stem cells [34]. Importantly, understanding the role of Wnt/ β -catenin signaling in T cell differentiation has potential therapeutic implications, as modulating this pathway may enhance the production of memory T cells, which are essential for effective immune responses [35]. However, its exact role remains not fully understood in Th17 biology. Lee et al. (2012) [36] have shown that inhibition of this signaling pathway fosters human Th17 differentiation. A similar phenomenon has been observed in murine Th17 lymphocytes [37].

So far, only a few studies have focused on the polarization of canine lymphocytes towards the Th17 phenotype [38,39], although the domestic dog is a useful model for

comparative medicine. Many characteristics appear to make dogs a very attractive translational model for both immunology and oncology research [40]. Numerous features of the innate and adaptive immune system are similar in dogs and humans. In addition, the main subsets of immune cells identified in dogs have comparable phenotypes to human immune cells [41]. The dog model offers several advantages over the xenograft rodent model in oncology research, including similar tumor genetics, epidemiology, biology, prognostic factors, treatment responses, and clinical outcomes [40,42,43]. Additional similarities include the natural and spontaneous occurrence of cancer in dogs, as well as the course of disease progression [42]. Canine models are increasingly being used for the investigation of many human cancers, including sinonasal carcinoma, brain cancer, B cell lymphoma, leukemia, osteosarcoma, melanoma, and invasive uroepithelial cancers [44,45].

Therefore, the aim of this study was to develop a novel Th17 cell differentiation protocol for CD4⁺ T lymphocytes isolated from the peripheral blood of companion dogs (*Canis lupus familiaris*), improved with an effective activation method based on magnetic EpoxyBeads coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies. In addition, we proposed to target Wnt/ β -catenin pathway and investigated the potential application of its selected modulators to enhance the in vitro differentiation of canine Th17 cells.

2. Results

2.1. CD4⁺ T Cells Isolated from Canine Peripheral Blood Are Effectively Activated by EpoxyBeads

The gating strategy involved distinguishing lymphocytes based on cell size and granularity (FSC vs. SSC) and excluding cell doublets (FSC-H vs. FSC-A). Only viable (Horizon v450⁻) CD5⁺ T lymphocytes were included in the further flow cytometry analyses. The vast majority of isolated lymphocytes were T cells (Figure 1A). The isolation of CD4⁺ T cells enabled us to obtain a pure population of helper T cells (Figure 1B,C).

Activation with higher concentrations of EpoxyBeads (ratios 2:1 and 1:1) allowed us to achieve a comparable effect to activation with Concanavalin A (ConA) (Figure 1D,E). The percentage of T cells expressing CD25 molecule was $88.9 \pm 6.9\%$ and $78.4 \pm 11.4\%$ (mean $\pm$ SD) at 2:1 and 1:1 EpoxyBeads to CD4⁺ T cells ratio, respectively, and $87.3 \pm 3.7\%$ when stimulated with ConA (Figure 1D,E). The two most effective ratios of EpoxyBeads to T cells (2:1 and 1:1), as well as treatment with ConA, resulted in a significantly higher expression of the CD25 activation marker ($p < 0.001$) compared to unstimulated control cells ($7.8 \pm 2.8\%$). Interestingly, lower concentrations of EpoxyBeads, applied in ratios of 0.5:1 and 0.25:1, showed weaker stimulation of activation ($52.0 \pm 12.2\%$ and $30.3 \pm 15.8\%$, respectively) (Figure 1D,E). Based on these results, the ratio 1:1 of EpoxyBeads to canine CD4⁺ T cells was selected for further experiments. Given the similar level of activation achieved by the two highest concentrations of EpoxyBeads, the choice also depended on the level of cell viability in culture. We noted that cells' viability was higher when the 1:1 ratio was applied (Supplementary Figure S1).

2.2. Differentiation of Activated T Lymphocytes Towards the Th17 Phenotype Can Be Achieved with the Appropriate Programming Medium

Our next research step determined whether isolated canine CD4⁺ T cells could be successfully programmed in vitro to the Th17 phenotype. We analyzed the number of cells synthesizing IL-17, the hallmark cytokine produced by Th17 lymphocytes, and we determined the expression level of ROR γ t, which is the main transcription factor of Th17 cells. Additionally, the number of CD4⁺ T cells synthesizing IFN- γ was evaluated. Our data showed that application of a specific programming medium containing cytokines: IL-1 β , IL-6 (as well as IL-2 and IL-23 added during long-term culture), growth factor:

TGF- β and the anti-canine IL-4 antibody, resulted in T cell differentiation within 10 days of in vitro culture (Figure 2). Canine T cells activated by EpoxyBeads applied in the 1:1 ratio (EpoxyBeads to CD4⁺ T cells) responded significantly more effectively ($p < 0.001$) to the programming medium than cells treated with ConA. Among the CD4⁺ T cell population $39.6 \pm 16.8\%$ of cells showed intracellular expression of IL-17, which means that these cells actively synthesized IL-17. In the population of cells activated with ConA IL-17⁺ T lymphocytes constituted $20.0 \pm 9.9\%$ of the population. In the unstimulated cells (NS), the percentage of IL-17⁺ T lymphocytes was only $1.9 \pm 1.8\%$ (Figure 2A,C). Among the population of canine T cells activated with EpoxyBeads, $35.2 \pm 12.7\%$ of cells also expressed IFN- γ . The percentage of IFN- γ ⁺ T cells in EpoxyBeads-activated T cells was significantly lower ($p < 0.01$) than in the population of ConA-activated T cells that showed $50.4 \pm 11.2\%$ of cells expressing IFN- γ . In the population of unstimulated cells, the percentage of IFN- γ ⁺ T cells was significantly lower ($0.9 \pm 0.85\%$) than in T cells stimulated with EpoxyBeads or ConA ($p < 0.001$) (Figure 2B,C). In addition, the expression of the ROR γ t transcription factor was assessed by measuring the mean fluorescence intensity (MFI) in the analyzed canine T cell population. Compared to unstimulated controls, both ConA-activated and EpoxyBeads-activated CD4⁺ T cells showed significantly higher expression of ROR γ t (MFI = 3.4 ± 0.8 and 3.1 ± 0.9 , respectively) (Figure 2D,E).

2.3. The Application of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway Modulators Affects the Efficiency of CD4⁺ T Lymphocyte Programming Towards the Th17 Phenotype

To broadly assess how the modulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway impacts differentiation towards the Th17 phenotype, we evaluated IL-17 and IFN- γ production as well as ROR γ t expression in CD4⁺ T cells cultured in the programming medium supplemented with indomethacin, XAV939 (Wnt/ β -catenin pathway inhibitors), or TWS119 (Wnt/ β -catenin pathway activator). Considering the results from previous experiments, showing that activation with EpoxyBeads promotes Th17 polarization, we designed subsequent experiments using only this stimulation method. As expected, the addition of indomethacin to the programming medium resulted in a significant increase ($p < 0.05$) in the number of IL-17⁺ T lymphocytes ($61.0 \pm 13.6\%$) when compared to control cells (Ctrl Th17) ($39.6 \pm 16.8\%$) that comprised CD4⁺ T cells activated and cultured in programming medium with no signaling pathway modulator (Figure 3A,C). Conversely, in the presence of TWS119 the percentage of IL-17⁺ T cells significantly decreased ($18.7 \pm 13.2\%$) ($p < 0.001$) compared to the indomethacin-treated cells and was lower than in control cells (Ctrl Th17) (Figure 3A,C). XAV939 had no impact on Th17 cells polarization ($41.1 \pm 18.9\%$) (Figure 3A,C). Our data indicated that neither indomethacin nor XAV939 affected IFN- γ production, as the percentage of IFN- γ ⁺ T cells was similar in indomethacin-treated, XAV939-treated, and control cells ($40.1 \pm 13.9\%$, $38.0 \pm 10.8\%$, and $35.2 \pm 12.7\%$, respectively) (Figure 3B,C). However, the addition of TWS119 significantly reduced the number of cells synthesizing IFN- γ in the population of canine CD4⁺ T cells ($18.7 \pm 10.0\%$) (Figure 3B,C). To investigate the effect of factors modifying the Wnt/ β -catenin signaling pathway on the expression of the ROR γ t transcription factor, we assessed the relative mean fluorescence intensity (MFI) (Figure 3D,E). Control Th17 lymphocytes and T cells treated with indomethacin or XAV939 showed a significantly higher expression of ROR γ t when compared to unstimulated cells (MFI = 3.1 ± 0.9 , 3.0 ± 0.8 and 3.0 ± 1.0 , respectively). In contrast, the addition of TWS119 to the programming medium resulted in a statistically significant decrease ($p < 0.05$) in the expression of this transcription factor when compared to Ctrl Th17 cells (MFI = 2.0 ± 0.4) (Figure 3D,E).

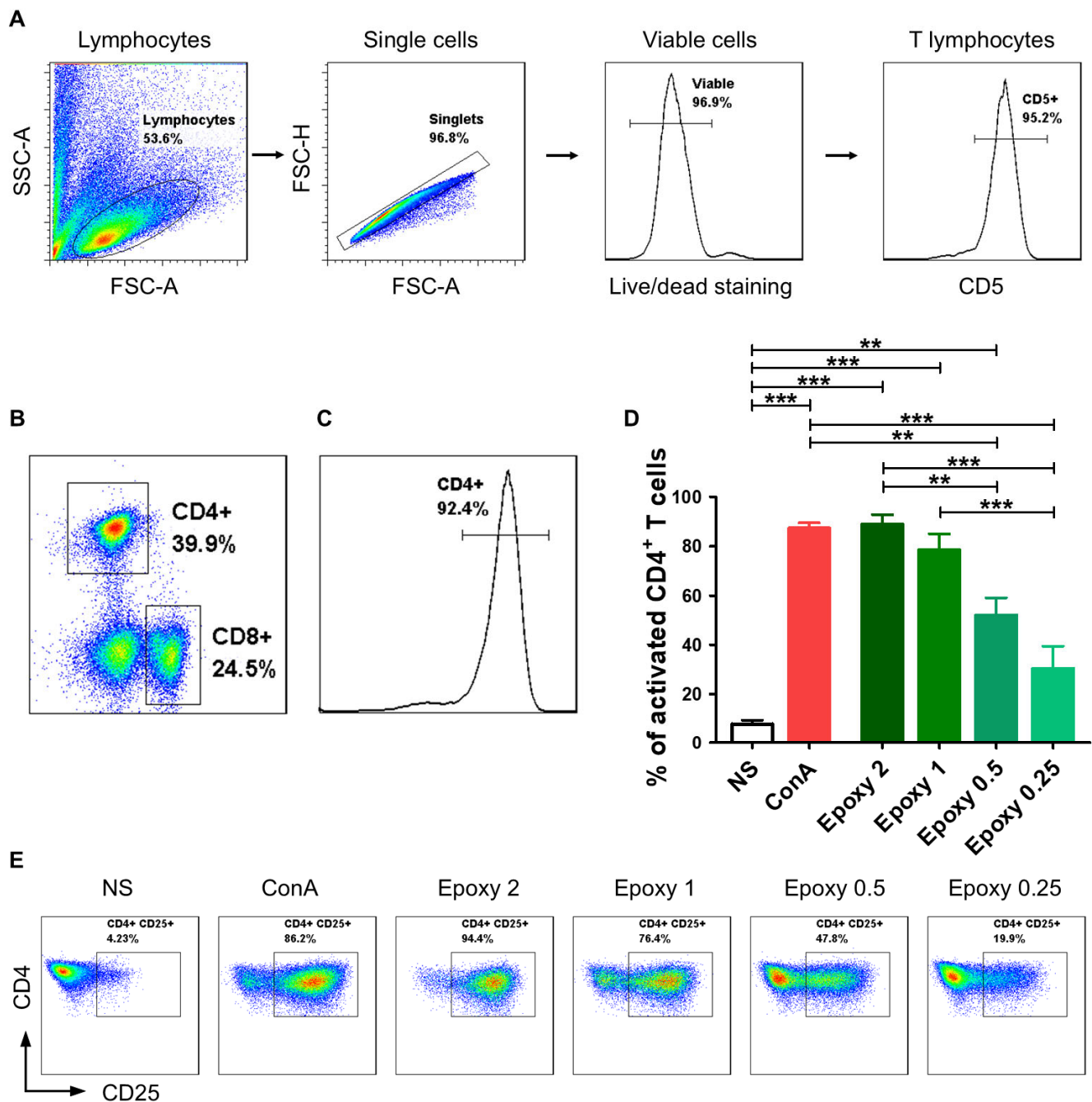


Figure 1. Canine CD4⁺ T lymphocytes were effectively activated using magnetic EpoxyBeads. Canine CD4⁺ T cells were isolated with the pluriBead Cell Separation Kit and analyzed by multicolor flow cytometry (FACS Aria II, Becton Dickinson). (A) Gating strategy for flow cytometry analysis. T lymphocytes were gated based on FSC and SSC. Only singlets and viable cells (v450 negative) were gated for further analysis. Among the analyzed cells, the vast majority consisted of CD5⁺ T cells. (B) Within T lymphocytes group, two subpopulations were distinguished based on CD4 and CD8 α surface expression. (C) Isolation of CD4⁺ T cells with the pluriBead Cell Separation Kit allowed us to obtain high population purity (above 90%). (D) Bar graph showing mean percentage of activated canine CD4⁺ T cells 24 h post-stimulation with EpoxyBeads and ConA. Data are shown as the mean results of three separate isolations ($n = 3$), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (E) Representative cytograms of CD25 expression in CD4⁺ T lymphocytes after stimulation with different EpoxyBeads to CD4⁺ T cells ratios (FACS Aria II, Becton Dickinson).

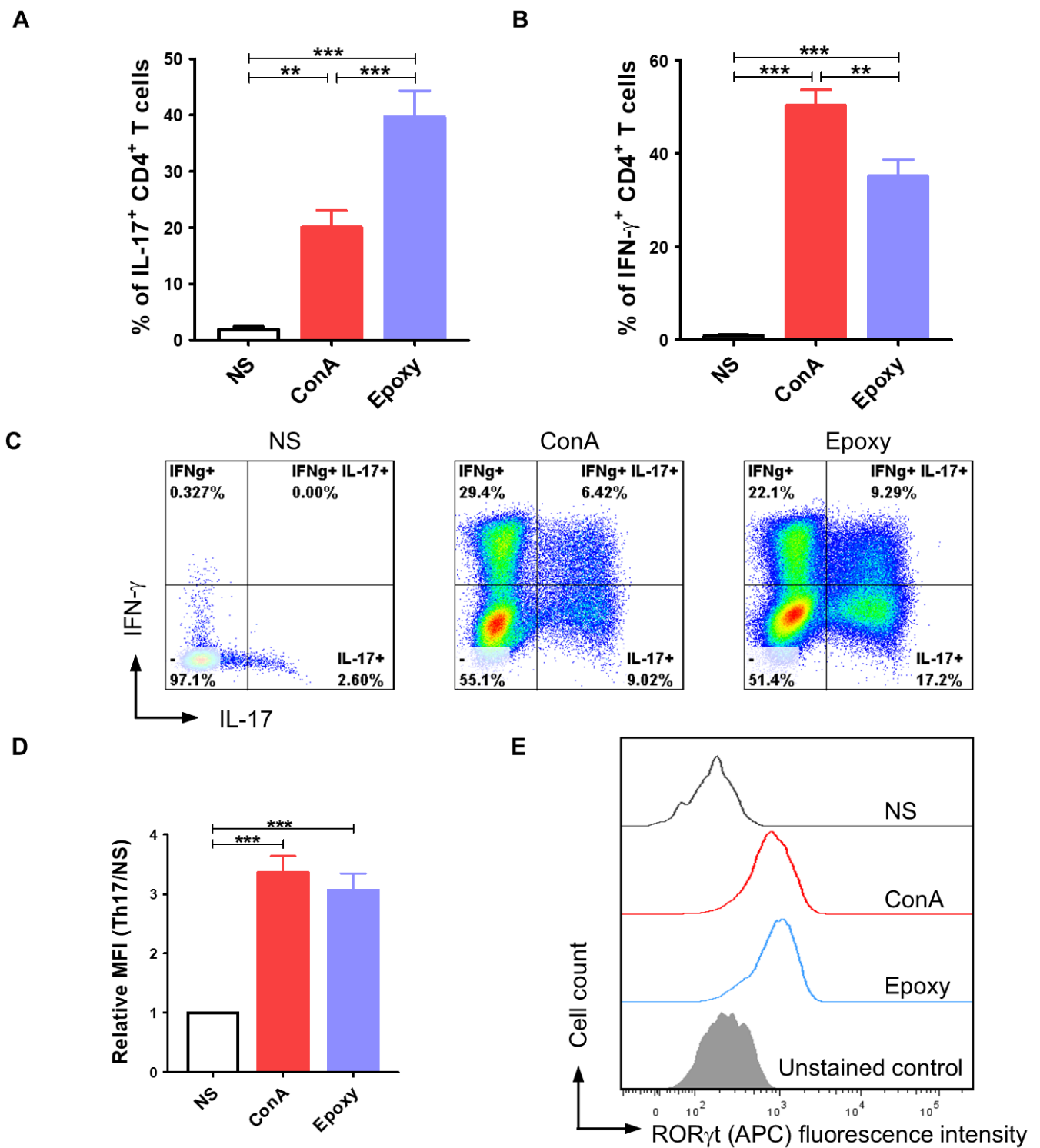


Figure 2. Application of a proper programming medium led to differentiation of canine CD4⁺ T lymphocytes towards the Th17 phenotype. Quantification of IL-17 (A) and IFN-γ (B) production after activation with ConA or magnetic EpoxyBeads and 10-day culture in the presence of programming medium. Data are shown as the mean results for cells isolated from at least 11 dogs, and error bars indicate SEM. (C) Representative flow cytometry cytograms of IL-17- and IFN-γ-producing CD4⁺ T cells. (D,E) Bar graph and representative histograms showing relative mean fluorescence intensity (MFI) of RORγt. Data are shown as the mean results for cells isolated from at least 9 dogs, and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

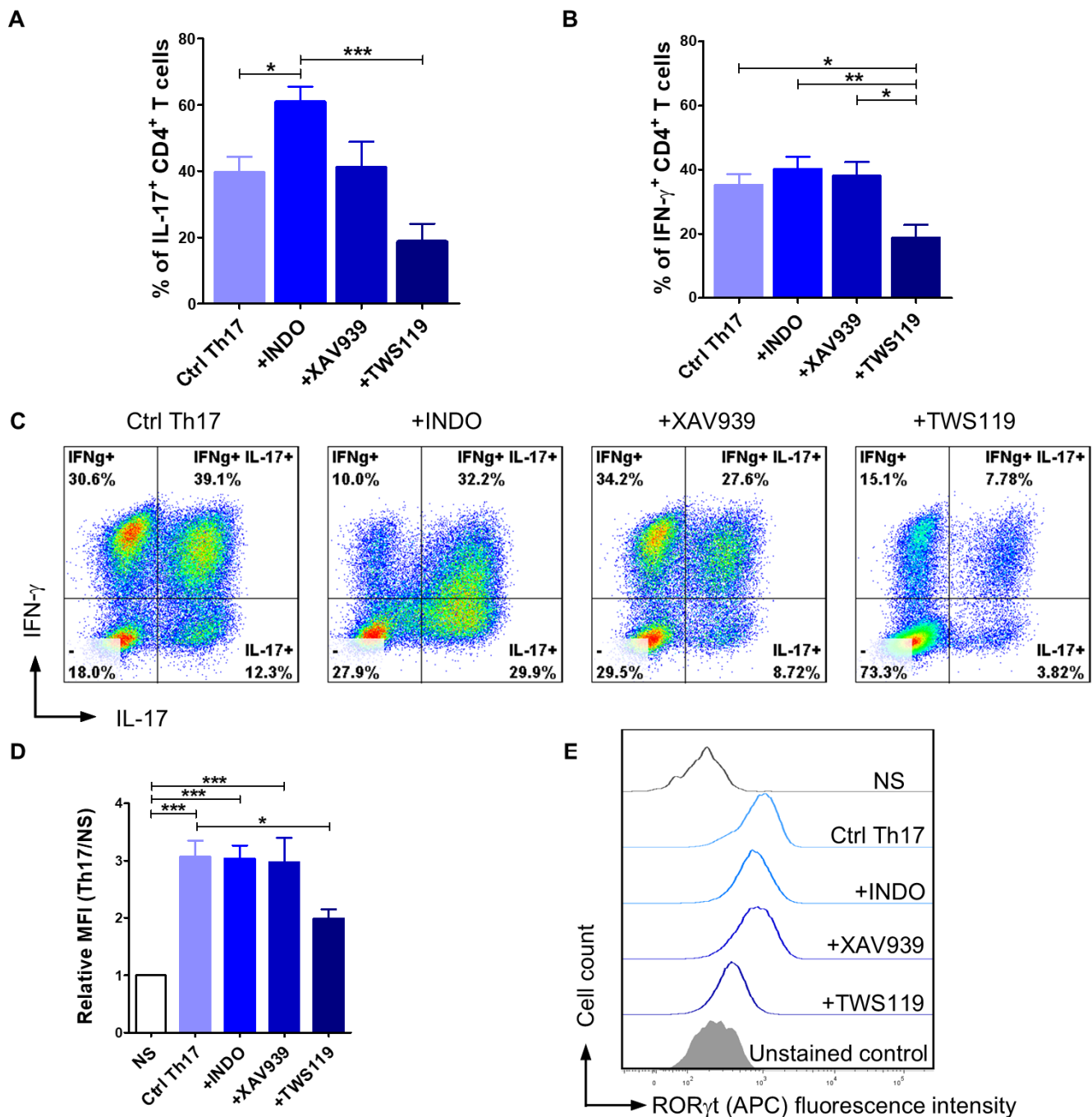


Figure 3. The effect of Wnt/ β -catenin signaling pathway modulators on the efficiency of CD4⁺ T lymphocyte programming towards the Th17 phenotype. Quantification (**A,B**) and representative cytograms (**C**) of IL-17 and IFN- γ production after activation with magnetic EpoxyBeads and 10-day culture in the presence of programming medium (Ctrl Th17) and selected modifying factors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Indo, XAV939, TWS119). Data are shown as the mean results for cells isolated from at least six dogs, and error bars indicate SEM. (**D,E**) Bar graph and representative histograms showing relative mean fluorescence intensity (MFI) of ROR γ t. Data are shown as the mean results for cells isolated from at least 11 dogs, and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.4. Th17 Polarization Promotes the Acquiring of an Effector-Memory T Cell Phenotype

To determine the memory profile of canine CD4⁺ T cells, we defined the CD44/CD62L expression pattern. Previous studies by Rothe et al. (2017) [46] demonstrated that based on

the expression of these two molecules, it is possible to distinguish three subpopulations of T lymphocytes: naïve T cells ($T_{\text{Naïve}}$, $CD44^{\text{low}}CD62L^{\text{high}}$), central-memory T cells (T_{CM} , $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{high}}$), and effector-memory T cells (T_{EM} , $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}$). Our flow cytometry analysis revealed that more than 75% of Ctrl Th17 cells acquired the effector-memory phenotype (T_{EM} , $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}$) ($77.6 \pm 16.9\%$) (Figure 4A,B). The stimulation of cells with indomethacin ($78.8 \pm 13.4\%$) or XAV939 ($74.6 \pm 16.9\%$) provided similar results to the control conditions (Ctrl Th17). The average percentage of central-memory T cells (T_{CM} , $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{high}}$) in the above conditions (Ctrl Th17, indomethacin-treated, XAV939-treated) did not exceed 25% (Figure 4A,B). In contrast, TWS119 treatment caused a significant increase in the percentage of the central-memory T cell subpopulation (T_{CM} , $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{high}}$) ($62.8 \pm 18.8\%$), with a concomitant decrease in the percentage of the effector-memory T cells (T_{EM} , $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}$) ($36.9 \pm 19.0\%$) (Figure 4A,B).

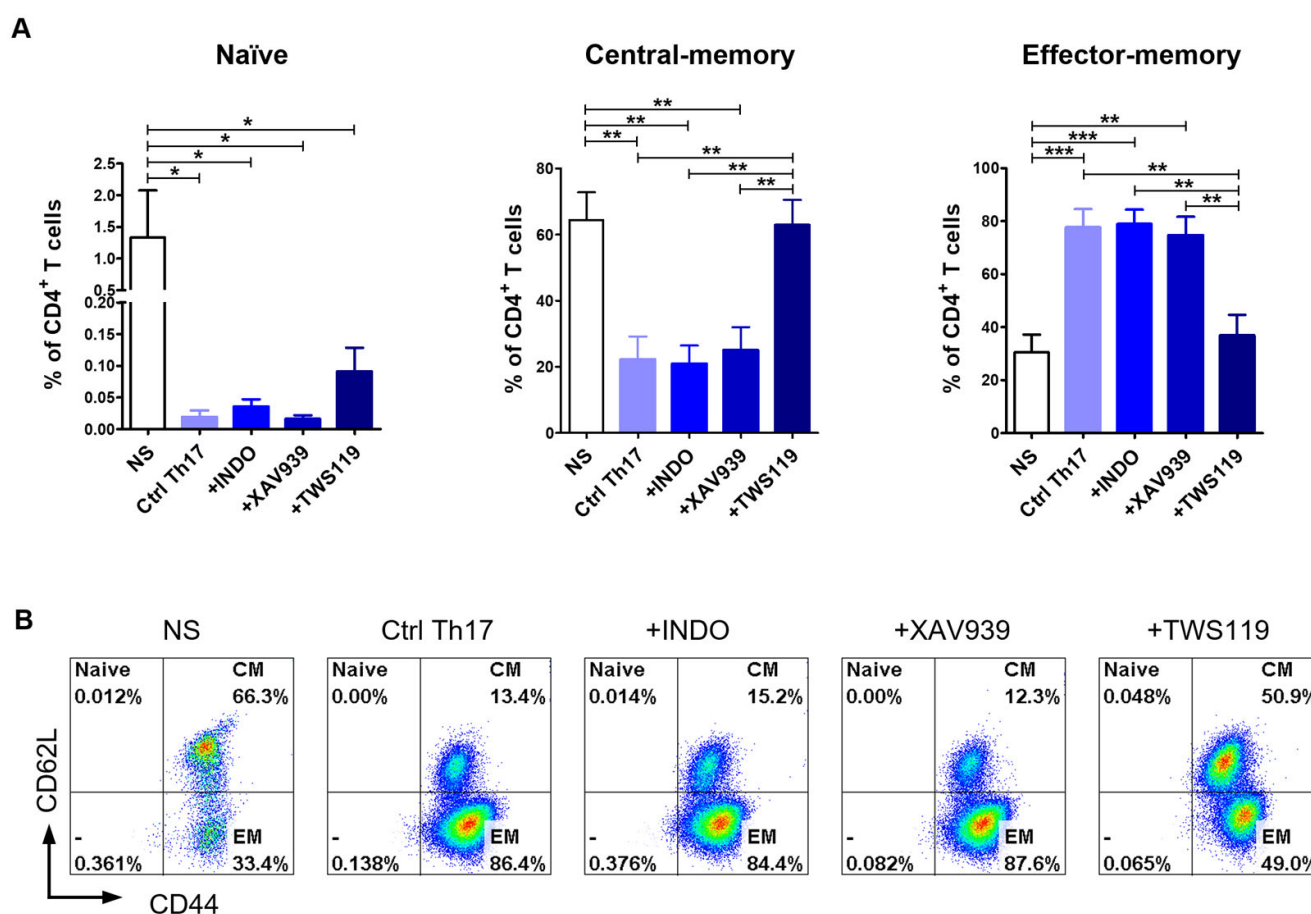


Figure 4. Differentiation towards the Th17 phenotype resulted in changes in the memory T cell phenotype. (A) Bar graph showing percentage of naïve T cells ($T_{\text{Naïve}}$, $CD44^{\text{low}}CD62L^{\text{high}}$); central-memory T cells (T_{CM} , $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{high}}$) and effector-memory T cells (T_{EM} , $CD44^{\text{high}}CD62L^{\text{low}}$) upon 10-day differentiation of $CD4^+$ T lymphocytes using selected inhibitors and an activator of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Indo, XAV939, TWS119). Data are shown as the mean results for cells isolated from six dogs ($n = 6$), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (B) Representative flow cytometry cytograms of different memory T cells populations under the tested conditions.

2.5. Differentiation Towards the Th17 Phenotype Involves Changes in Mitochondrial Activity

Considering that T cell metabolism changes depending on their differentiation and memory phenotype status, we examined how the differentiation of T lymphocytes towards the Th17 phenotype alters the mass and activity of their mitochondria. For this purpose,

we evaluated the relative mean fluorescence intensity (MFI) after MitoTracker and TMRM staining of the mitochondria. Our study showed no statistically significant differences in mitochondrial content (MitoTracker staining) (Figure 5A,B) and mitochondrial potential (TMRM staining) (Figure 5C,D). In both cases, the average fluorescence intensity was only slightly higher in Th17-polarized cells when compared to unstimulated cells. No changes were observed between the control cells (Ctrl Th17) (1.6 ± 0.4 ; 1.3 ± 0.2) and cells treated with indomethacin (1.4 ± 0.3 ; 1.3 ± 0.2), XAV939 (1.4 ± 0.2 ; 1.2 ± 0.1) or TWS119 (1.5 ± 0.1 ; 1.3 ± 0.1) (MFI $\pm$ SD for MitoTracker and TMRM staining, respectively).

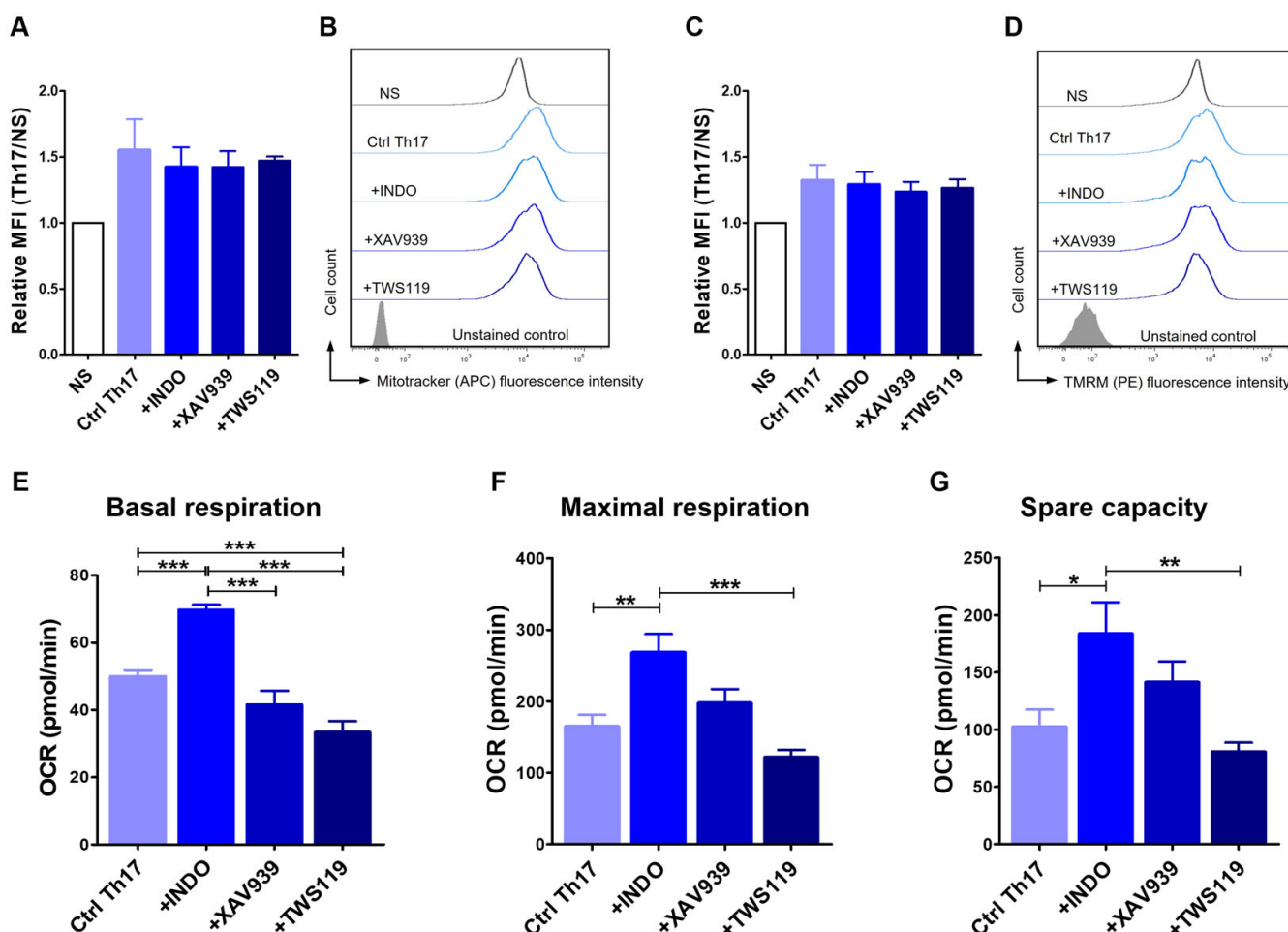


Figure 5. Differentiation towards the Th17 phenotype involved changes in mitochondrial activity. Relative mean fluorescence intensity (MFI) and representative histograms of MitoTracker (A,B) and tetramethylrhodamine methyl ester - TMRM (C,D) staining (FACS Aria II, Becton Dickinson) after 24 h culture in programming medium. The bar graphs show the mean results for cells isolated from 3 dogs ($n = 3$), and error bars indicate SEM. Bar graphs showing oxygen consumption rate (OCR) in terms of basal respiration (E), maximal respiration (F), and spare respiratory capacity (G) of CD4⁺ T lymphocytes after 72 h differentiation with programming medium and administration of selected modifying factors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Indo, XAV939, TWS119) (Seahorse XF HS Mini, Agilent Technologies). The bar graphs show the mean results for cells isolated from at least six dogs, and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

To further analyze the metabolism of Th17 lymphocytes, we performed an analysis of key parameters of mitochondrial function by directly measuring the oxygen consumption rate (OCR) using The Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test. We considered three crucial characteristics, such as basal respiration, maximal respiration, and spare ca-

capacity. At the basal level, cells treated with indomethacin showed significantly higher OCR (69.7 ± 4.0 pmol/min) when compared to control (49.9 ± 6.3 pmol/min), XAV939-treated (41.58 ± 10.1 pmol/min) or TWS119-treated cells (33.7 ± 8.2 pmol/min) (Figure 5E). The latter had a statistically significantly lower OCR compared to the control cells ($p < 0.001$). However, no differences were observed between cells treated with XAV939 and control (Figure 5E). Th17 cells programmed with indomethacin were also characterized by high levels of OCR in the context of maximal respiration (268.1 ± 63.7 pmol/min). Significant differences were found when compared to control cells (164.8 ± 56.1 pmol/min), and cells treated with TWS119 (121.8 ± 25.4 pmol/min) (Figure 5F). The last evaluated parameter was spare respiratory capacity, defined as the difference between maximal and basal respiration. Spare respiratory capacity is a measure of a cell ability to respond to increased energy demands. This parameter also confirmed the increased OCR of indomethacin-treated T cells (183.8 ± 67.0 pmol/min), which were statistically significant when compared to control (102.4 ± 52.6 pmol/min) and TWS119-treated (80.7 ± 19.5 pmol/min) cells (Figure 5G).

3. Discussions

The domestic dog model is becoming more appreciated in comparative medicine research. Dog models of cancer are particularly valuable, as canine cancers more closely reflect human tumors biology, genetics, histology, and response to treatment [40,44]. The examination of dogs with cancer can provide information that brings a broad perspective to comparative biology. Although inbred laboratory rodents are used in standard clinical trials, the incorporation of different breeds of dogs in such studies should be regarded as an added advantage, as it also takes into account genetic variation [43]. However, there are numerous limitations regarding the procedures used for the isolation, culture, and differentiation of cells obtained from dogs [44]. Therefore, the aim of our study was to develop a protocol for effective activation and differentiation towards the Th17 phenotype of CD4⁺ T lymphocytes isolated from the peripheral blood of pet dogs. We also assessed the memory phenotype and mitochondrial activity of canine CD4⁺ T cells.

Bead-based activation has been described as accessible and effective in protocols involving both human and canine T lymphocytes. In our previous studies, we developed the method for canine lymphocyte activation using nano-sized magnetic beads coated with anti-canine CD3/CD28 antibodies. We revealed that this is an effective method to promote T lymphocyte proliferation and function, and that the higher cell culture temperature (38.5 °C) promotes the activation process [47]. However, this method did not provide satisfactory results for the activation of the isolated CD4⁺ T cell population. Hence, in the present study, we aimed to improve the activation method using epoxylated magnetic beads. These beads are much larger in diameter (4.5 µm) and offer the possibility of removing them from the cell culture once the signal for activation has been induced. Mason and colleagues also applied a method involving epoxylated magnetic beads (termed Dynabeads in their studies) [48–50]. They assessed the effects of activation with the plant mitogenic lectins (ConA), human immortalized erythroleukemic K562 cells (artificial antigen presenting cells, APCs) and beads-based stimulation on canine T cells. Stimulation with APCs induced the greatest T cell division and cell expansion among all activation methods used. The efficiency of activation with magnetic Dynabeads showed a wide variability depending on the donor, being effective in some canine samples and failing in others [48]. However, another study by Panjwani et al. (2020) [49] demonstrated an important advantage of activation using magnetic Dynabeads coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies. Lymphocytes activated with this method exhibited a higher efficiency of lentiviral transduction, highlighting the utility of this activation method in developing CAR T cell therapy. Moreover, CAR T cells activated with this approach exhibit

potent anti-tumor efficacy after administration into canine patients with spontaneous diffuse large B cell lymphoma [49]. In our present study, we optimized the concentration of magnetic EpoxyBeads to ensure the most effective canine CD4⁺ T lymphocyte activation. We described higher ratios of EpoxyBeads to T cells as more effective. This agrees with the study by Panjwani et al. (2016) [48], in which a 3:1 ratio of Dynabeads to T cells was used. However, we additionally showed that the highest used concentration (2:1 EpoxyBeads to CD4⁺ T cells) simultaneously caused a decrease in T cell viability. This prompted us to use a 1:1 ratio in our experiments, as it was not significantly different from 2:1 ratio. Also, the published protocols for the clinical-scale generation of canine CAR T product from canine peripheral mononuclear cells acknowledge the possibility of successful lymphocyte activation using such a Dynabeads to T cells ratio [50].

Next, we investigated the in vitro induction of the Th17 phenotype in canine CD4⁺ T cells. Our studies showed that activated canine CD4⁺ T lymphocytes can be differentiated in the presence of the appropriate programming medium. It comprised IL-1 β , IL-6, TGF- β , and the anti-canine IL-4 antibody. During long-term culture, IL-2 and IL-23 were also added. The use of these factors promoted differentiation towards the Th17 phenotype expressed by a significantly increased percentage of IL-17 producing CD4⁺ T cells. These findings are in line with previously published studies focused on the differentiation of canine Th17 cells [38,39]. Ritt et al. (2015) [39] investigated the effect of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TGF- β) on production of IL-17 by canine CD4⁺ and CD8⁺ T cells. They observed a modest increase in the percentage of IL-17-producing cells among both helper and cytotoxic T lymphocytes. Results varied across the four investigated donors, achieving the highest value of 12.4% (CD4⁺IL-17⁺) and 17.6% (CD8⁺IL-17⁺). The results of another research group indicated that the use of a programming medium containing IL-1 β , IL-6, TGF- β , and the anti-canine IL-4 antibody yielded almost 30% of cells producing IL-17 [38]. In both mentioned studies, the method of T lymphocyte activation was the administration of ConA [38,39]. However, our study showed that the application of magnetic EpoxyBeads for canine CD4⁺ T cell activation further enhanced the differentiation process. The percentage of canine CD4⁺IL-17⁺ T lymphocytes was significantly higher for EpoxyBeads-treated than for ConA-treated cells. Additionally, we showed that this activation method promoted the Th17 phenotype due to a significant decrease in IFN- γ production, when compared to T cells activated with ConA. Therefore, it is not only the optimal composition of the programming medium that influences the efficiency of differentiation, but also the appropriate method of T lymphocyte activation. Another difference between the method we developed and the previously published studies was the administration of IL-2 and IL-23 in the long-term culture of canine Th17 lymphocytes. IL-2 was added as a factor that promotes T lymphocyte proliferation, whereas IL-23 provided the stabilization of Th17 lymphocytes properties and their survival. A study on mouse lymphocytes demonstrated that the addition of IL-23 to in vitro cultures maintained the ability of these cells to produce IL-17. The removal of IL-23 supplementation resulted in diminished IL-17 production as well as down-regulation of Th17-related gene expression (including *Il17f*, *Il23r*, *Il22*, and *Rorc*) [30]. However, it is important to note that our research encountered several challenging stages. Th17 cells exhibit significant context-dependent plasticity, allowing them to acquire functional characteristics of Th1 cells, such as increased production of IFN- γ [51]. This phenomenon has been observed both in vivo and in vitro. For this reason, protocols for differentiating human and mouse Th17 cells include the use of an anti-IFN- γ antibody to prevent Th17 into Th1-like transformation. Therefore, we also tested the use of the anti-canine IFN- γ antibody during the optimization of the programming medium composition. We observed that the addition of anti-canine IFN- γ antibody to the programming medium did not reduce the production of IFN- γ by canine

T cells. Based on this observation, we decided not to include the anti-IFN- γ antibody in the final programming medium composition. Additionally, due to the possible presence of Th1-like cells, we attempted to determine the percentage of Th1 cells in the obtained cell population by assessing the expression level of the T-box transcription factor T-bet, which is characteristic of Th1 cells. However, we were unable to do so because of the limited availability of canine-specific antibodies. In contrast to humans and mice, studies in dogs are hindered by a more restricted repertoire of commercially available reagents, a concern also highlighted by other researchers [52]. Nevertheless, it is worth highlighting that we obtained the highest percentage of canine Th17 cells in *in vitro* culture compared to results from other studies published so far. In addition, while developing the canine Th17 cell differentiation protocol, we also considered its potential for future use in generating lymphocytes for adoptive cell transfer (ACT). Remarkable features of Th17 cells in the context of ACT, such as higher *in vivo* survival, self-renewal capacity and less senescence, are considered to be associated with the superior plasticity of this subset compared to polarized Th1 cells, which have less plasticity and higher phenotypic stability [51]. These features seem to be necessary for antitumor activity of Th17 cells in ACT therapy, and the ability to produce IFN- γ , may even enhance their anti-tumor properties, as previously demonstrated in a mouse model [37].

Considering the studies on human [36] and mice [37] T lymphocytes, we hypothesized that modification of the Wnt/ β -catenin signaling pathway may promote the differentiation of canine Th17 cells *in vitro*. The Wnt/ β -catenin signaling pathway was previously found to promote self-renewal and multipotency of haematopoietic stem cells and to regulate the development of thymocytes at various stages [53–56]. Furthermore, the Wnt/ β -catenin signaling cascade is considered to play a complex role, not only in regulating T cell development, but also in the differentiation of mature peripheral T cells [33,57]. In our study, we examined the effect of three factors modifying the signaling pathway: indomethacin, XAV939, and TWS119. Indomethacin, although does not belong to the group of specific Wnt/ β -catenin pathway inhibitors, causes a downregulation of β -catenin transcription, as well as an induction of protein degradation [58]. XAV939 is a small molecule inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway, that functions through binding to tankyrase and stabilizing the Axin protein, thereby preventing its degradation. Axin is a key component of the β -catenin destruction complex. It promotes phosphorylation, enhances degradation of β -catenin, and reduces β -catenin nuclear accumulation, leading to reduced transcriptional activation of Wnt target genes [59,60]. TWS119 inhibits glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and thus activates Wnt/ β -catenin pathway, causing the accumulation and nuclear translocation of β -catenin [61]. Our study revealed that the administration of indomethacin resulted in a significant increase in the number of canine CD4⁺ T lymphocytes producing IL-17 in comparison to control cells. Previous studies showed a similar effect on mouse T lymphocytes [37]. However, studies performed by Kol and colleagues (2016) [38] on canine cells did not show similar results. The addition of indomethacin did not significantly increase IL-17 production. Importantly, the concentration of the inhibitor (10 μ M) used by Kol et al. (2016) [38] was six-fold lower when compared to the protocol we developed (60 μ M). Despite the use of two different inhibitors in our study, only indomethacin promoted Th17 differentiation, while XAV939 had no significant effect on the examined properties of T cells. The discrepancies in the effect of the two inhibitors used, XAV939 and indomethacin, may result from differences in their mode of action on β -catenin. Indomethacin is a well-known nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that nonselectively inhibits cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) [62]. Importantly, reports indicated an inhibitory effect of prostaglandins (PGE2) on the differentiation of human and murine Th17 lymphocytes [63]. However, studies conducted on canine T cells by

Kol and colleagues (2016) [38] clearly demonstrated the absence of such an effect. Therefore, the impact of indomethacin in the context of prostaglandin-mediated effects on Th17 lymphocyte differentiation was not addressed within the framework of this study. Additionally, indomethacin acts as a non-specific modulator of several signaling pathways. It has been described as a modulator of NF- κ B [64,65], PI3K/Akt [66], as well as a Wnt/ β -catenin signaling pathway [67–69], making it an interesting bioactive molecule, that can be used in various studies on modifications of cell signaling pathways. The application of indomethacin in our research significantly enhanced the differentiation of canine CD4⁺ T cells towards the Th17 phenotype, increasing IL-17 production and the expression of the transcription factor ROR γ t. The opposite effect to that observed following indomethacin administration was observed after the addition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway activator, TWS119, that significantly impaired the differentiation of canine CD4⁺ T cells. The percentage of IL-17⁺, as well as ROR γ t⁺ T cells was clearly decreased compared to control cells, although the results were not statistically significant due to differences among blood donors. However, the results significantly decreased compared to the indomethacin-treated cells. In addition, the percentage of IFN- γ ⁺ T cells was significantly lower in comparison to all other tested conditions. Similar research using canine T cells has not been published so far, but studies on mouse models confirm that applications of TWS119 contribute to the arrest of T lymphocytes differentiation. Gattinoni et al. (2009) [70] showed that the addition of TWS119 to pmel-1 transgenic TCR mouse CD8⁺ T cells led to inhibition of their differentiation and function. Our observations agree also with studies on human T lymphocytes conducted by Muralidharan et al. (2011) [33]. The group reported general differentiation inhibition of T cells derived from peripheral blood as well as umbilical cord blood. One of the characteristic features was a decrease in IFN- γ production after TWS119 administration ($17\% \pm 11\%$), compared to control cells ($41\% \pm 16\%$). The described percentage of IFN- γ ⁺ T cells appears very similar to that obtained in our study. Muralidharan et al. (2011) [33] also assessed the expression of transcription factors and cytokines associated with several T lymphocyte subpopulations, including Th17 cells. Similarly to our results, TWS119-treated cells showed reduced expression of ROR γ t and IL-17. Results regarding other parameters suggest that TWS119 does not affect a specific subpopulation of CD4⁺ T cells (Th1, Th2, Th17 or Treg), but rather has similar inhibitory effects on all subsets [33]. Overall, the administration of indomethacin enhanced canine Th17 lymphocyte differentiation. Although we did not observe a definitive action of XAV939 in this context, the clear impact of TWS119, diminishing canine Th17 cell differentiation via Wnt/ β -catenin signaling pathway activation, supports the hypothesis that the Wnt/ β -catenin signaling pathway is involved in this process.

In the next step of our study, we categorized the canine CD4⁺ T cells into different subsets based on their migration patterns, which provide insights into their functional roles. Previous studies conducted by Rothe et al. [46] indicated the possibility of using CD44/CD62L surface expression to distinguish the following canine T cell subpopulations: naïve T cells (T_{Naïve}, CD44^{low}CD62L^{high}); central-memory T cells (T_{CM}, CD44^{high}CD62L^{high}), and effector-memory T cells (T_{EM}, CD44^{high}CD62L^{low}). CD62L (L-selectin) is a marker present on naïve T cells and further allows to differentiate central-memory (CD62L⁺) from effector-memory (CD62L[−]) T cells, as it is shed from the cell membrane upon T cell activation. The regulation of CD62L is crucial for controlling the trafficking of T lymphocytes to and from peripheral lymph nodes [71]. CD44, in turn, is upregulated following the activation of naïve T lymphocytes in response to antigen stimulation and remains elevated on the surface of memory T cells, which mediate the secondary immune response [72]. Our study showed a high percentage of T_{EM} lymphocytes (above 75%) upon differentiation of cells in the programming medium alone, and with the addition

of Wnt/ β -catenin signaling pathway inhibitors (indomethacin and XAV939). These results indicate that canine CD4⁺ T cells provided with an appropriate activation stimulant and differentiated in the programming medium acquire an effector phenotype. It may be characterized by a preferential migration to peripheral tissues and rapid mediation of effector functions [73]. In addition, this process was not significantly affected by the addition of indomethacin or XAV939. So far, no studies have characterized how modifications of the Wnt/ β -catenin signaling pathway affect the memory phenotype of canine T lymphocytes. However, a similar pattern was described for mouse and human T lymphocytes, where an increase in CD44 expression was observed during T cell differentiation, with a simultaneous gradual loss of CD62L expression [74]. In contrast, the application of TWS119, an activator of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, led to a markedly increased percentage of T_{CM} cell subpopulation, accompanied by a decrease in the percentage of T_{EM} cells. Several research groups described the inhibitory effect of TWS119 on differentiation of human and mice T cells [33,70]. Gattinoni et al. (2009) [70] demonstrated that TWS119 arrested differentiation of CD8⁺ T cells and negatively regulated differentiation of effector T cells. Administration of TWS119 increased the frequency of T cells that retained CD62L expression, which is typical of naïve T cells and T_{CM} [70]. Data published so far suggest that Wnt/ β -catenin signaling pathway is a negative regulator of T cell differentiation in human and mice T lymphocytes [33,70]. Thus, additional activation of this signaling pathway promotes the arrest of T cell differentiation, which was also confirmed in our study.

Many recent studies have focused on how activity, differentiation stage and memory phenotype affect T lymphocyte metabolism [75–78]. In our study, we also assessed how differentiation towards the Th17 phenotype impacts mitochondrial mass and activity. Flow cytometry analysis revealed that mitochondrial mass content as well as mitochondrial potential were increased in all experimental conditions compared to non-stimulated cells. However, these differences did not reach statistical significance. To determine the in-depth energy utilization of canine lymphocytes programmed towards the Th17 phenotype, we used real-time measurement of the oxygen consumption rate (OCR). We observed that the addition of indomethacin led to the highest rates of canine Th17 cell stimulation and differentiation, which was reflected in the level of OCR. These T cells were characterized by the most efficient oxidative phosphorylation (OXPHOS) in terms of basal and maximum respiration rates, as well as spare respiratory capacity. In contrast, the administration of TWS119 caused a significant decrease in OCR for all tested parameters (basal and maximum respiration, spare respiratory capacity). Our data suggest that the addition of indomethacin, which among others is known to inhibit the Wnt/ β -catenin signaling pathway, and thus yields a higher percentage of Th17 cells, results in a shift in metabolism in favor of OXPHOS rather than glycolysis. T lymphocytes employ different metabolic pathways depending on their differentiation and memory status [75–78]. Naïve and memory T cells use OXPHOS to survive in a quiescent state. However, exposure to antigen results in naïve T cell differentiation into effector cells and in metabolic changes, including the use of glycolysis for efficient cytokine secretion. Our results show some discrepancy with these tendencies, indicating the use of OXPHOS by canine Th17 cells, which exhibit an effector-memory phenotype. However, the current literature indicates that T_{EM} cells use both glycolysis as well as the mitochondrial machinery, allowing them to respond rapidly to secondary antigen encounter by the production of effector cytokines [75]. Additionally, recent studies focusing on Th17 cells revealed that they rapidly increase mitochondrial respiration during development. Moreover, this process appeared to be necessary for metabolic reprogramming upon T cell activation [79]. It may be associated with the stemness properties of Th17 cells and the ability of these long-lived T cells to survive and maintain an effector phenotype [80]. Importantly, it also has been shown

that modifications of various signaling pathways can lead to the reprogramming of T cell metabolism and changes in mitochondrial fitness [81]. So far, the role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in regulating T cell metabolism has not been studied. However, it has been shown that the overstimulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in glioma cells shifts their metabolism toward glycolysis [82]. This is consistent with our findings concerning TWS119-treated T cells, which showed a reduced OCR when compared to T lymphocytes cultured with indomethacin. This observation may suggest increased glycolysis in T lymphocytes with an activated Wnt/ β -catenin signaling pathway. Overall, heterogeneous subsets of T cells present differences in metabolic commitment, even within classically defined populations [83].

Our study has certain limitations that should be considered. The primary limitation is the inability to determine the precise mechanism by which indomethacin promotes the differentiation of CD4⁺ T lymphocytes towards the Th17 phenotype. Despite the significant effect following the addition of indomethacin to the programming medium, we were unable to definitively elucidate the underlying mechanism responsible for this process. As indomethacin is a non-specific modulator, future research should investigate its effects in the context of various signaling pathways, not only the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Additionally, the distinct effects of prostaglandins on Th17 lymphocyte differentiation should be explored in future studies. Moreover, a negative effect of Wnt/ β -catenin pathway activation via TWS119 is apparent. Reversing this mechanism through the activation of GSK-3 β could enable the assessment of the impact of Wnt/ β -catenin signaling inhibition. A comprehensive investigation of the biological mechanisms underlying Th17 lymphocyte differentiation was beyond the scope of this study. Nonetheless, our findings provide a solid foundation for further research.

In conclusion, despite the aforementioned limitations, this study demonstrated the method of canine Th17 lymphocyte differentiation *in vitro* as well as phenotypic and metabolic changes that are involved in this process. The research confirmed that canine CD4⁺ T lymphocytes isolated from the peripheral blood can be successfully activated with EpoxyBeads coated with anti-canine CD3 and CD28 antibodies, and the use of proposed programming medium effectively promotes the differentiation of these cells towards the Th17 phenotype. Additionally, we characterized these cells as effector-memory T lymphocytes. To the best of our knowledge, this is the first study that combined an activation method based on engagement of T cell receptor (CD3) and a costimulatory molecule (CD28) together with culture in the programming medium to obtain high percentage of canine Th17 cells. Moreover, in our study we investigated the potential application of Wnt/ β -catenin signaling pathway modulators to further enhance the efficiency of canine Th17 lymphocyte differentiation process. The administration of indomethacin, which affects various signaling pathways, including its inhibitory role on the Wnt/ β -catenin pathway activity, led to a significant increase in the number of canine CD4⁺ T cells producing IL-17. These findings suggest that indomethacin may be further exploited in the future, with reference to its stimulatory role in Th17 lymphocyte differentiation. Furthermore, by assessing mitochondrial activity, we discovered these cells were characterized by the most efficient oxidative phosphorylation. Given the promising properties of Th17 cells in adoptive cellular immunotherapy, this research not only broadens the understanding of canine Th17 lymphocyte biology but may also contribute to the development of adoptive immunotherapy in veterinary medicine.

4. Materials and Methods

4.1. Isolation of Canine Peripheral Blood CD4⁺ T Lymphocytes

Canine peripheral blood was obtained from healthy donors of Warsaw Specialist Blood Bank. All donors included in the study were vaccinated up to date against infectious diseases (Parvovirus, Distemper virus, Adenovirus-2, Parainfluenza virus and Rabies) and were regularly dewormed. The anticoagulated blood was diluted with sterile PBS in a ratio 1:2 prior administration to a density gradient medium (Lymphoprep, Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) that was used to isolate canine peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Density gradient centrifugation was performed in SepMate PBMC isolation tubes (Stemcell Technologies, Canada) at $800 \times g$, 10 min, at room temperature (RT). Afterwards, the isolated cells were washed twice with PBS supplemented with 2mM EDTA and 2% FBS and treated with erythrocyte lysis buffer (ACK lysing buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 4 min at RT. After the erythrocyte lysis procedure, the remaining cells were washed with sterile PBS and enumerated using automated cell counter (Countess II Automated Cell Counter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). To determine viability of isolated PBMC, staining with 4% Trypan blue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used. Cells were resuspended in T cell medium composed of RPMI-1640 GlutaMAXTM medium supplemented with 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 0.1% HEPES, and 1% antibiotics: penicillin and streptomycin (all from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PBMCs were cultured overnight (38.5 °C, 5% CO₂) at a density of 2×10^6 cells/mL in 6-well plates (Corning, New York, NY, USA) for monocyte/macrophage depletion via plastic adherence. The following day, CD4⁺ T cells were isolated using pluriBead Cell Separation Kit and S-pluriBeads coated with anti-canine CD4 antibodies (pluriSelect Life Science, Leipzig, Germany) according to the manufacturer's instructions.

4.2. Activation and Differentiation of CD4⁺ T Cells

Our previous research demonstrated that canine T lymphocytes are effectively activated by magnetic MicroBeads [47]. In the present study, we optimized the method of canine CD4⁺ T cell activation by testing the effect of using different ratios of epoxylated magnetic beads (DynabeadsTM M-450 Epoxy, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), described as "EpoxyBeads", coated with cross-linking anti-canine CD3 (clone CA17.2A12, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and anti-canine CD28 (clone 1C6, Functional Grade, eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) antibodies in the concentration recommended by the manufacturer. For the activation assessment, CD4⁺ T cells were seeded at a density of 2×10^6 cells/mL in 48-well plates (Corning, New York, NY, USA) in T cell medium and activated with EpoxyBeads. To optimize the method and ensure the best possible activation status, CD4⁺ T cells were incubated for 24 h at either 2:1, 1:1, 0.5:1 or 0.25:1 ratio of EpoxyBeads to T cells or with 5 µg/mL Concanavalin A (ConA, natural mitogen) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) that was used as a positive control. Upon 24 h of stimulation using EpoxyBeads or ConA we analyzed the surface expression of activation marker—CD25 molecule (an α chain of receptor for IL-2) using flow cytometry.

In order to differentiate cells towards the Th17 phenotype, lymphocytes were activated with EpoxyBeads or ConA, and a programming medium was used, composed of T cell medium (described above) with addition of recombinant canine IL-1 β (10 ng/mL), recombinant canine IL-6 (5 ng/mL), recombinant human TGF- β (2 ng/mL) and anti-canine IL-4 antibody (2 ng/mL) (all from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). For long-term culture, EpoxyBeads were removed from the culture on day 3, and the medium was additionally supplemented with recombinant canine IL-2 (10 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and human recombinant IL-23 (30 ng/mL) (Gibco, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA). To remove the EpoxyBeads, the suspension containing T cells and beads was pipetted and transferred to 2 mL Eppendorf tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). The tubes were then placed in a magnetic rack (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After 3 min, the medium containing lymphocytes was carefully transferred back to the culture plates (Corning, New York, NY, USA). In addition, in experiments evaluating the effect of Wnt/ β -catenin signaling pathway modification, the programming medium was supplemented with selected signaling pathway modifying factors: indomethacin (60 μ M, inhibitor of Wnt/ β -catenin pathway), XAV939 (1 μ M, a Tankyrase inhibitor, thereby inhibiting Wnt/ β -catenin signaling) or TWS119 (2 μ M, a Wnt/ β -catenin pathway activator) (all from Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Cells were cultured at 38.5 °C in a humidified incubator, 5% CO₂ (Sanyo Electric, Ltd., Osaka, Japan), harvested on the days indicated and used for flow cytometry analysis and real-time cell metabolic analysis performed using Seahorse XFp Cell Mito Stress. The schematic workflow illustrating the main steps of the study is presented in Figure 6.

4.3. Flow Cytometry Analysis

CD4⁺ T cells were washed with sterile FACS buffer (PBS supplemented with 2% FBS). To block non-specific antibody binding, the cells were pretreated with Fc Receptor Binding Inhibitor Polyclonal Antibody (eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 20 min at 4 °C. Next, the cells were resuspended in 100 μ L of FACS buffer and stained with LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). At the same time, an appropriate amount of mouse primary antibodies was added, and the cells were stained for 20 min at RT in dark. The following antibodies were used to analyze the expression level of surface molecules and activation markers: anti-canine CD4-APC (clone YKIX302.9), anti-canine CD8a-v450 (clone YCATE55.9), anti-canine CD5-PerCP-eFluor710 (clone YKIX322.3), and anti-canine CD25-FITC (clone P4A10) (all from eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In addition, rat anti-canine CD44-Alexa Fluor 488 (clone YKIX337.8.7) and mouse anti-human CD62L-PE (clone FMC46) antibodies (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were used for memory phenotype staining. After incubation with antibodies, cells were washed twice with FACS buffer, centrifuged at 300 $\times$ g for 4 min and resuspended in 200 μ L of FACS buffer for analysis.

The mitochondrial assay involved staining with two dyes: Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) and MitroTracker (both from Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). CD4⁺ T cells were harvested after 24 h of culture, resuspended in warm T cell medium with TMRM (250 nM) and Mitotracker (125 nM), and incubated for 30 min at 37 °C protected from light. The cells were then centrifuged and resuspended in 200 μ L of warm FACS buffer for cytometric analysis.

Flow cytometry analyses were performed using a BD FACS Aria II flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Each time, at least 50,000 events per sample were recorded. Data obtained were analyzed with FlowJo 7.6.1 software (TreeStar Inc., Ashland, OR, USA). Lymphocytes were gated according to their size and granularity using forward-scatter (FSC) and side-scatter (SSC) parameters. Dead cells and doublets were excluded from further analysis. Gating strategy is presented in Figure 1A.

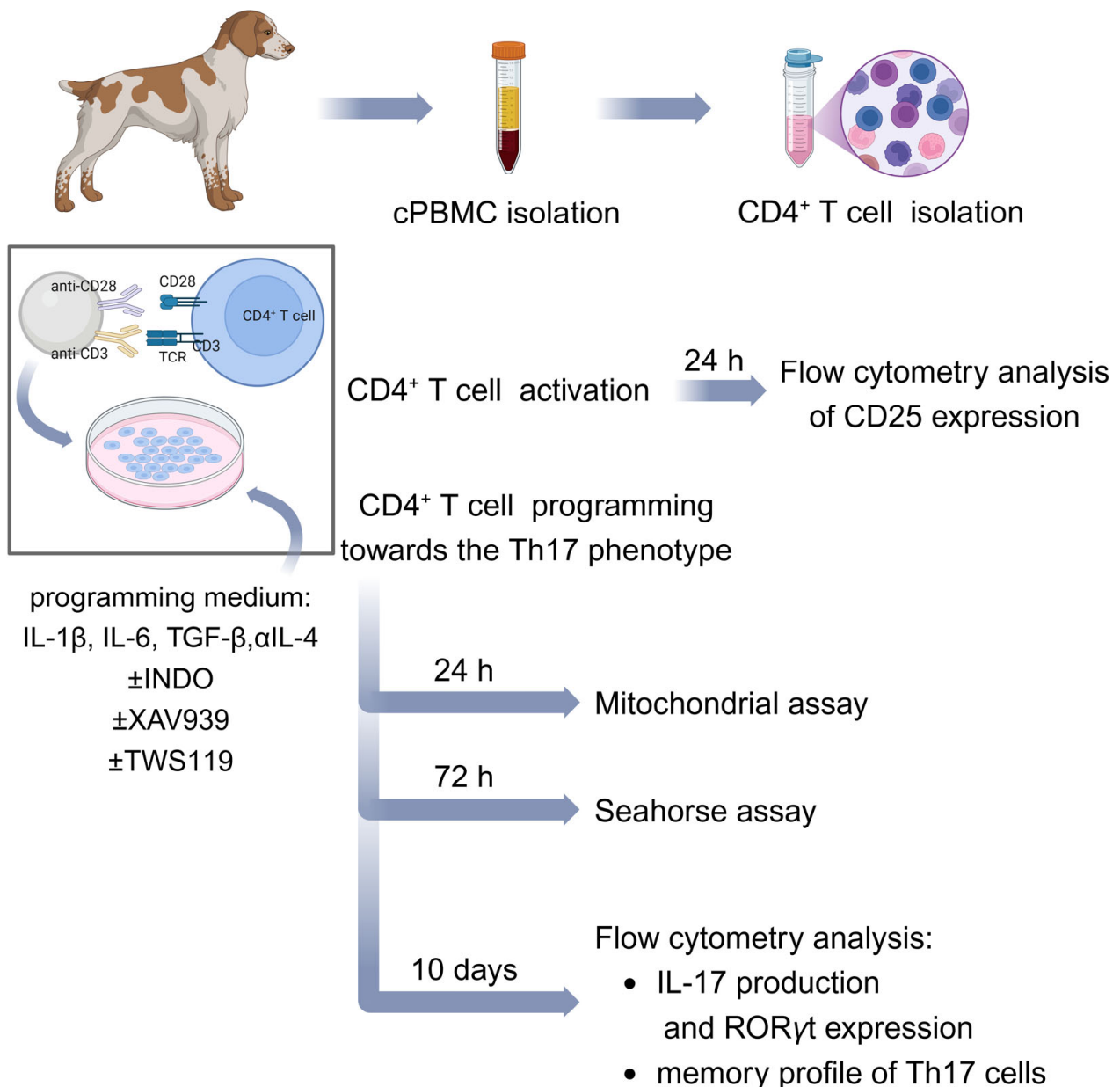


Figure 6. Summarized methodology of the study. Schematic representation of canine CD4⁺ T cell activation and differentiation towards the Th17 phenotype described in Section 4. Created in BioRender. Gajewska, M. (2025) <https://BioRender.com/v89x776>.

4.4. Flow Cytometric Analysis of Cytokines and Transcription Factors Characteristic of Th17 Cells

In order to achieve differentiation of canine CD4⁺ T lymphocytes towards the Th17 phenotype, the cells were cultured for 10 days in the programming medium described in Section 2.2. Next, the cells were re-stimulated for 6 h with 15 ng/mL Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) and 500 ng/mL Ionomycin (both from R&D systems, Minneapolis, MN) in the presence of Brefeldin A (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) added 2 h after the beginning of incubation. This step allowed stimulation of cytokine synthesis with concomitant inhibition of cytokine secretion. Subsequently, CD4 surface antigen was stained with rat anti-canine CD4-PE-Cyanine7 (clone YKIX302.9) (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), followed by an intracellular staining for cytokines and transcription factors performed using Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were washed and resuspended in Fixation/Permeabilization buffer for 45 min at 4 °C. Next, cells were

suspended in primary antibodies diluted in permeabilization buffer and incubated for 20 min at RT. The following antibodies with confirmed canine cross-reactivity were used for intracellular staining: anti-human IL-17A-PerCP-Cyanine5.5 (clone eBio64DEC17), anti-human/mouse ROR γ t-APC (clone AFKJS-9) (both from eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and mouse anti-bovine IFN- γ -Alexa Fluor 488 antibody (clone CC302) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After staining, cells were washed twice with FACS buffer and analyzed using BD FACS Aria II flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) with the principles described above.

4.5. Seahorse Assay

The oxygen consumption rate (OCR) was determined using a Seahorse XF HS Mini analyzer and the Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. CD4⁺ T cells were activated and cultured for 72 h in the presence of programming medium and factors modifying Wnt/ β -catenin signaling pathway (as described above). Afterwards, cells were seeded onto Seahorse XFp 8-well plates (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at a density of 0.5×10^6 cells per well/180 μ L in Seahorse XF RPMI Medium supplemented with 1 mM pyruvate, 2 mM L-glutamine and 10 mM glucose (all from Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Cell culture plates were incubated for 1 h at 37 °C in a non-CO₂ incubator prior to analysis. The corresponding Seahorse medium was used to prepare the solutions of all compounds using in the assay. The following volumes of each compound were pre-loaded into the respective ports of the cartridge: Port A: oligomycin, 20 μ L, final concentration: 1.5 μ M; Port B: FCCP, 22 μ L, final concentration: 1.5 μ M; Port C: a mix of rotenone and antimycin A, 25 μ L, final concentration: 0.5 μ M. All measurements were performed in duplicate. The data obtained were analyzed with Agilent Seahorse Analytics software available online (<https://seahorseanalytics.agilent.com>; accessed on 12 November 2024) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4.6. Statistical Analysis

Statistical analysis of data was performed using GraphPad PrismTM 5.0 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). For comparisons between multiple groups, a One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test was performed (as indicated in the figure legends). Symbols indicate significant differences between the specified groups, as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms26104946/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, I.M.S. and K.M.-K.; formal analysis, I.M.S. and M.G.; funding acquisition, I.M.S. and K.M.-K.; investigation, I.M.S., R.P., M.K. and M.T.; methodology, I.M.S.; project administration, I.M.S. and K.M.-K.; resources, I.M.S. and K.M.-K.; supervision, M.G. and K.M.-K.; visualization, I.M.S.; writing—original draft, I.M.S.; writing—review and editing, I.M.S., M.G. and M.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the grant No. POIR.04.04.00-00-3EE9/17-00 entitled "Modification of signaling pathways of canine Th17 lymphocytes subset to improve adoptive cellular immunotherapy for humans" carried out within the First TEAM programme of the Foundation for Polish Science co-financed by the European Union under the European Regional Development Fund, Smart Growth Operational Programme 2014-2020 (to Kinga Majchrzak-Kuligowska) and by NATIONAL SCIENCE CENTER POLAND grant number 2023/49/N/NZ5/03656 (to Iwona Szopa) entitled "Determining the role of Th17 lymphocyte-secreted cytokines in the development of canine melanoma—in vitro studies". The publication was financed by Science development fund of the Warsaw University of Life Sciences—SGGW.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article and Supplementary Materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

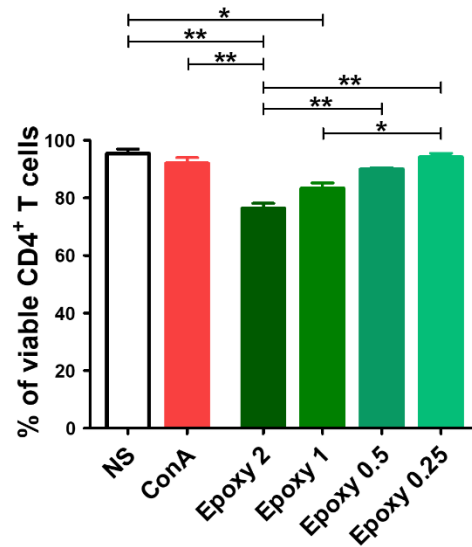
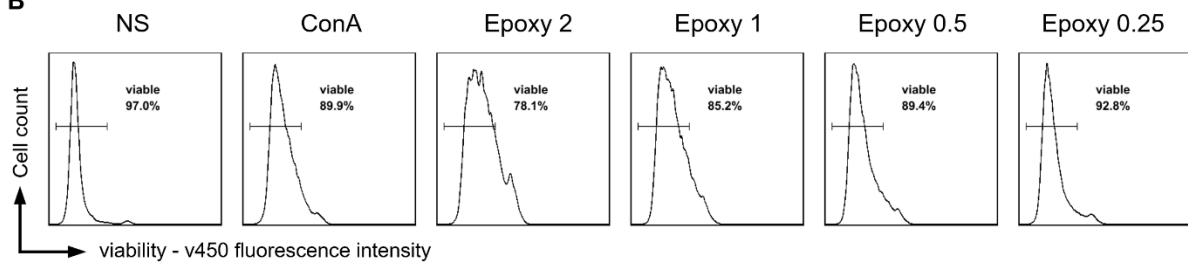
1. Park, H.; Li, Z.; Yang, X.O.; Chang, S.H.; Nurieva, R.; Wang, Y.-H.; Wang, Y.; Hood, L.; Zhu, Z.; Tian, Q.; et al. A Distinct Lineage of CD4 T Cells Regulates Tissue Inflammation by Producing Interleukin 17. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 1133–1141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Noack, M.; Miossec, P. Th17 and Regulatory T Cell Balance in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 668–677. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Maddur, M.S.; Miossec, P.; Kaveri, S.V.; Bayry, J. Th17 Cells. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 8–18. [\[CrossRef\]](#)
4. Mensikova, M.; Stepanova, H.; Faldyna, M. Interleukin-17 in Veterinary Animal Species and Its Role in Various Diseases: A Review. *Cytokine* **2013**, *64*, 11–17. [\[CrossRef\]](#)
5. Martinez, N.E.; Sato, F.; Kawai, E.; Omura, S.; Chervenak, R.P.; Tsunoda, I. Regulatory T Cells and Th17 Cells in Viral Infections: Implications for Multiple Sclerosis and Myocarditis. *Future Virol.* **2012**, *7*, 593–608. [\[CrossRef\]](#)
6. Ouyang, W.; Kolls, J.K.; Zheng, Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* **2008**, *28*, 454–467. [\[CrossRef\]](#)
7. Marques, H.S.; de Brito, B.B.; da Silva, F.A.F.; Santos, M.L.C.; de Souza, J.C.B.; Correia, T.M.L.; Lopes, L.W.; Neres, N.S.d.M.; Dórea, R.S.D.M.; Dantas, A.C.S.; et al. Relationship between Th17 Immune Response and Cancer. *World J. Clin. Oncol.* **2021**, *12*, 845–867. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Moser, T.; Akgün, K.; Proschmann, U.; Sellner, J.; Ziemssen, T. The Role of TH17 Cells in Multiple Sclerosis: Therapeutic Implications. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102647. [\[CrossRef\]](#)
9. Lubberts, E. The IL-23–IL-17 Axis in Inflammatory Arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11*, 415–429. [\[CrossRef\]](#)
10. Baumgart, D.C.; Carding, S.R. Inflammatory Bowel Disease: Cause and Immunobiology. *Lancet* **2007**, *369*, 1627–1640. [\[CrossRef\]](#)
11. Martin, J.C.; Baeten, D.L.; Josien, R. Emerging Role of IL-17 and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Immunol.* **2014**, *154*, 1–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Huang, J.; Li, X.; Zhu, Q.; Wang, M.; Xie, Z.; Zhao, T. Imbalance of Th17 Cells, Treg Cells and Associated Cytokines in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1425847. [\[CrossRef\]](#)
13. Marinoni, B.; Ceribelli, A.; Massarotti, M.S.; Selmi, C. The Th17 Axis in Psoriatic Disease: Pathogenetic and Therapeutic Implications. *Autoimmun. Highlights* **2014**, *5*, 9–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Newcomb, D.C.; Peebles, R.S. Th17-Mediated Inflammation in Asthma. *Curr. Opin. Immunol.* **2013**, *25*, 755–760. [\[CrossRef\]](#)
15. Tamamoto-Mochizuki, C.; Santoro, D.; Saridomikelakis, M.N.; Eisenschenk, M.N.C.; Hensel, P.; Pucheu-Haston, C.; International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). Update on the Role of Cytokines and Chemokines in Canine Atopic Dermatitis. *Vet. Dermatol.* **2024**, *35*, 25–39. [\[CrossRef\]](#)
16. Marsella, R. Advances in Our Understanding of Canine Atopic Dermatitis. *Vet. Dermatol.* **2021**, *32*, 547. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Freundt-Revilla, J.; Maiolini, A.; Carlson, R.; Beyerbach, M.; Rentmeister, K.; Flegel, T.; Fischer, A.; Tipold, A. Th17-Skewed Immune Response and Cluster of Differentiation 40 Ligand Expression in Canine Steroid-Responsive Meningitis-Arteritis, a Large Animal Model for Neutrophilic Meningitis. *J. Neuroinflamm.* **2017**, *14*, 20. [\[CrossRef\]](#)
18. Barber, R.; Barber, J. Differential T-Cell Responses in Dogs with Meningoencephalomyelitis of Unknown Origin Compared to Healthy Controls. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 925770. [\[CrossRef\]](#)
19. Muranski, P.; Boni, A.; Antony, P.A.; Cassard, L.; Irvine, K.R.; Kaiser, A.; Paulos, C.M.; Palmer, D.C.; Touloukian, C.E.; Ptak, K.; et al. Tumor-Specific Th17-Polarized Cells Eradicate Large Established Melanoma. *Blood* **2008**, *112*, 362–373. [\[CrossRef\]](#)
20. Muranski, P.; Borman, Z.A.; Kerkar, S.P.; Klebanoff, C.A.; Ji, Y.; Sanchez-Perez, L.; Sukumar, M.; Reger, R.N.; Yu, Z.; Kern, S.J.; et al. Th17 Cells Are Long Lived and Retain a Stem Cell-like Molecular Signature. *Immunity* **2011**, *35*, 972–985. [\[CrossRef\]](#)
21. Martin-Orozco, N.; Muranski, P.; Chung, Y.; Yang, X.O.; Yamazaki, T.; Lu, S.; Hwu, P.; Restifo, N.P.; Overwijk, W.W.; Dong, C. T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity* **2009**, *31*, 787–798. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Kryczek, I.; Zhao, E.; Liu, Y.; Wang, Y.; Vatan, L.; Szeliga, W.; Moyer, J.; Klimczak, A.; Lange, A.; Zou, W. Human TH17 Cells Are Long-Lived Effector Memory Cells. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 104ra100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Bowers, J.S.; Nelson, M.H.; Majchrzak, K.; Bailey, S.R.; Rohrer, B.; Kaiser, A.D.; Atkinson, C.; Gattinoni, L.; Paulos, C.M. Th17 Cells Are Refractory to Senescence and Retain Robust Antitumor Activity after Long-Term Ex Vivo Expansion. *JCI Insight* **2017**, *2*, e90772. [\[CrossRef\]](#)

24. Majchrzak, K.; Nelson, M.H.; Bailey, S.R.; Bowers, J.S.; Yu, X.-Z.; Rubinstein, M.P.; Himes, R.A.; Paulos, C.M. Exploiting IL-17-Producing CD4⁺ and CD8⁺ T Cells to Improve Cancer Immunotherapy in the Clinic. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *65*, 247–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zambrano-Zaragoza, J.F.; Romo-Martínez, E.J.; Durán-Avelar, M.D.J.; García-Magallanes, N.; Vibanco-Pérez, N. Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases. *Int. J. Inflamm.* **2014**, *2014*, 1–12. [[CrossRef](#)]
26. Veldhoen, M.; Hocking, R.J.; Atkins, C.J.; Locksley, R.M.; Stockinger, B. TGFβ in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports de Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* **2006**, *24*, 179–189. [[CrossRef](#)]
27. Alizadeh, D.; Katsanis, E.; Larmonier, N. The Multifaceted Role of Th17 Lymphocytes and Their Associated Cytokines in Cancer. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 957878. [[CrossRef](#)]
28. Yang, L.; Anderson, D.E.; Baecher-Allan, C.; Hastings, W.D.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K.; Hafler, D.A. IL-21 and TGF-β Are Required for Differentiation of Human T(H)17 Cells. *Nature* **2008**, *454*, 350–352. [[CrossRef](#)]
29. Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 485–517. [[CrossRef](#)]
30. Stritesky, G.L.; Yeh, N.; Kaplan, M.H. IL-23 Promotes Maintenance but Not Commitment to the Th17 Lineage. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 5948–5955. [[CrossRef](#)]
31. Clevers, H. Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* **2006**, *127*, 469–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ma, J.; Wang, R.; Fang, X.; Sun, Z. β-Catenin/TCF-1 Pathway in T Cell Development and Differentiation. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2012**, *7*, 750–762. [[CrossRef](#)]
33. Muralidharan, S.; Hanley, P.J.; Liu, E.; Chakraborty, R.; Bollard, C.; Shpall, E.; Rooney, C.; Savoldo, B.; Rodgers, J.; Dotti, G. Activation of Wnt Signaling Arrests Effector Differentiation in Human Peripheral and Cord Blood-Derived T Lymphocytes. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 5221–5232. [[CrossRef](#)]
34. Reya, T.; Duncan, A.W.; Ailles, L.; Domen, J.; Scherer, D.C.; Willert, K.; Hintz, L.; Nusse, R.; Weissman, I.L. A Role for Wnt Signalling in Self-Renewal of Haematopoietic Stem Cells. *Nature* **2003**, *423*, 409–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gattinoni, L.; Ji, Y.; Restifo, N.P. Wnt/β-Catenin Signaling in T Cell Immunity and Cancer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 4695–4701. [[CrossRef](#)]
36. Lee, Y.-S.; Lee, K.-A.; Yoon, H.-B.; Yoo, S.-A.; Park, Y.W.; Chung, Y.; Kim, W.-U.; Kang, C.-Y. The Wnt Inhibitor Secreted Frizzled-Related Protein 1 (sFRP1) Promotes Human Th17 Differentiation. *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 2564–2573. [[CrossRef](#)]
37. Majchrzak, K.; Nelson, M.H.; Bowers, J.S.; Bailey, S.R.; Wyatt, M.M.; Wrangle, J.M.; Rubinstein, M.P.; Varela, J.C.; Li, Z.; Himes, R.A.; et al. β-Catenin and PI3Kδ Inhibition Expands Precursor Th17 Cells with Heightened Stemness and Antitumor Activity. *JCI Insight* **2017**, *2*, e90547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kol, A.; Walker, N.J.; Nordstrom, M.; Borjesson, D.L. Th17 Pathway As a Target for Multipotent Stromal Cell Therapy in Dogs: Implications for Translational Research. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148568. [[CrossRef](#)]
39. Ritt, M.; Lindborg, B.; O'Brien, T.; Bisignano, J.; Modiano, J. Stimulation with Concanavalin-A Induces IL-17 Production by Canine Peripheral T Cells. *Vet. Sci.* **2015**, *2*, 43–51. [[CrossRef](#)]
40. Bujak, J.K.; Pingwara, R.; Nelson, M.H.; Majchrzak, K. Adoptive Cell Transfer: New Perspective Treatment in Veterinary Oncology. *Acta Vet. Scand.* **2018**, *60*, 60. [[CrossRef](#)]
41. Park, J.S.; Withers, S.S.; Modiano, J.F.; Kent, M.S.; Chen, M.; Luna, J.I.; Culp, W.T.N.; Sparger, E.E.; Rebhun, R.B.; Monjazeb, A.M.; et al. Canine Cancer Immunotherapy Studies: Linking Mouse and Human. *J. Immunother. Cancer* **2016**, *4*, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Khanna, C.; Lindblad-Toh, K.; Vail, D.; London, C.; Bergman, P.; Barber, L.; Breen, M.; Kitchell, B.; McNeil, E.; Modiano, J.F.; et al. The Dog as a Cancer Model. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1065–1066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Paoloni, M.; Khanna, C. Translation of New Cancer Treatments from Pet Dogs to Humans. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 147–156. [[CrossRef](#)]
44. Chow, L.; Wheat, W.; Ramirez, D.; Impastato, R.; Dow, S. Direct Comparison of Canine and Human Immune Responses Using Transcriptomic and Functional Analyses. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 2207. [[CrossRef](#)]
45. Kulka, M.; Brennan, K.; Mc Gee, M. Investigation of Canine Extracellular Vesicles in Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0274261. [[CrossRef](#)]
46. Rothe, K.; Bismarck, D.; Büttner, M.; Alber, G.; von Buttlar, H. Canine Peripheral Blood CD4⁺ CD8⁺ Double-Positive T Cell Subpopulations Exhibit Distinct T Cell Phenotypes and Effector Functions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2017**, *185*, 48–56. [[CrossRef](#)]
47. Szopa, I.M.; Granica, M.; Bujak, J.K.; Łabędź, A.; Błaszczyk, M.; Paulos, C.M.; Majchrzak-Kuligowska, K. Effective Activation and Expansion of Canine Lymphocytes Using a Novel Nano-Sized Magnetic Beads Approach. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 604066. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Panjwani, M.K.; Smith, J.B.; Schutsky, K.; Gnanandarajah, J.; O'Connor, C.M.; Powell, D.J.; Mason, N.J. Feasibility and Safety of RNA-Transfected CD20-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells in Dogs with Spontaneous B Cell Lymphoma. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 1602–1614. [[CrossRef](#)]

49. Panjwani, M.K.; Atherton, M.J.; MaloneyHuss, M.A.; Haran, K.P.; Xiong, A.; Gupta, M.; Kulikovsaya, I.; Lacey, S.F.; Mason, N.J. Establishing a Model System for Evaluating CAR T Cell Therapy Using Dogs with Spontaneous Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1676615. [\[CrossRef\]](#)
50. Rotolo, A.; Atherton, M.J.; Kasper, B.T.; Haran, K.P.; Mason, N.J. Genetic Re-Direction of Canine Primary T Cells for Clinical Trial Use in Pet Dogs with Spontaneous Cancer. *STAR Protoc.* **2021**, *2*, 100905. [\[CrossRef\]](#)
51. Muranski, P.; Restifo, N.P. Essentials of Th17 Cell Commitment and Plasticity. *Blood* **2013**, *121*, 2402–2414. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Moreira, M.L.; Dorneles, E.M.S.; Soares, R.P.; Magalhães, C.P.; Costa-Pereira, C.; Lage, A.P.; Teixeira-Carvalho, A.; Martins-Filho, O.A.; Araújo, M.S.S. Cross-Reactivity of Commercially Available Anti-Human Monoclonal Antibodies with Canine Cytokines: Establishment of a Reliable Panel to Detect the Functional Profile of Peripheral Blood Lymphocytes by Intracytoplasmic Staining. *Acta Vet. Scand.* **2015**, *57*, 51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Staal, F.J.T.; Luis, T.C.; Tiemessen, M.M. WNT Signalling in the Immune System: WNT Is Spreading Its Wings. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 581–593. [\[CrossRef\]](#)
54. Fleming, H.E.; Janzen, V.; Lo Celso, C.; Guo, J.; Leahy, K.M.; Kronenberg, H.M.; Scadden, D.T. Wnt Signaling in the Niche Enforces Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Is Necessary to Preserve Self-Renewal in Vivo. *Cell Stem Cell* **2008**, *2*, 274–283. [\[CrossRef\]](#)
55. Mulroy, T.; McMahon, J.A.; Burakoff, S.J.; McMahon, A.P.; Sen, J. Wnt-1 and Wnt-4 Regulate Thymic Cellularity. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 967–971. [\[CrossRef\]](#)
56. Okamura, R.M.; Sigvardsson, M.; Galceran, J.; Verbeek, S.; Clevers, H.; Grosschedl, R. Redundant Regulation of T Cell Differentiation and TCRalpha Gene Expression by the Transcription Factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* **1998**, *8*, 11–20. [\[CrossRef\]](#)
57. Willinger, T.; Freeman, T.; Herbert, M.; Hasegawa, H.; McMichael, A.J.; Callan, M.F.C. Human Naive CD8 T Cells Down-Regulate Expression of the WNT Pathway Transcription Factors Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 and Transcription Factor 7 (T Cell Factor-1) Following Antigen Encounter in Vitro and in Vivo. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 1439–1446. [\[CrossRef\]](#)
58. Dihlmann, S.; von Knebel Doeberitz, M. Wnt/Beta-Catenin-Pathway as a Molecular Target for Future Anti-Cancer Therapeutics. *Int. J. Cancer* **2005**, *113*, 515–524. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Huang, S.-M.A.; Mishina, Y.M.; Liu, S.; Cheung, A.; Stegmeier, F.; Michaud, G.A.; Charlat, O.; Wietzel, E.; Zhang, Y.; Wiessner, S.; et al. Tankyrase Inhibition Stabilizes Axin and Antagonizes Wnt Signalling. *Nature* **2009**, *461*, 614–620. [\[CrossRef\]](#)
60. Wu, X.; Luo, F.; Li, J.; Zhong, X.; Liu, K. Tankyrase 1 Inhibitor XAV939 Increases Chemosensitivity in Colon Cancer Cell Lines via Inhibition of the Wnt Signaling Pathway. *Int. J. Oncol.* **2016**, *48*, 1333–1340. [\[CrossRef\]](#)
61. Chen, Y.; Zheng, L.; Aldarouish, M.; Zhou, Z.; Pan, N.; Liu, J.; Chen, F.; Wang, L. Wnt Pathway Activator TWS119 Enhances the Proliferation and Cytolytic Activity of Human $\gamma\delta$ T Cells against Colon Cancer. *Exp. Cell Res.* **2018**, *362*, 63–71. [\[CrossRef\]](#)
62. Blobaum, A.L.; Uddin, J.; Felts, A.S.; Crews, B.C.; Rouzer, C.A.; Marnett, L.J. The 2'-Trifluoromethyl Analogue of Indomethacin Is a Potent and Selective COX-2 Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 486–490. [\[CrossRef\]](#)
63. Luz-Crawford, P.; Kurte, M.; Bravo-Alegria, J.; Contreras, R.; Nova-Lamperti, E.; Tejedor, G.; Noël, D.; Jorgensen, C.; Figueroa, F.; Djouad, F.; et al. Mesenchymal Stem Cells Generate a CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cell Population during the Differentiation Process of Th1 and Th17 Cells. *Stem Cell Res. Ther.* **2013**, *4*, 65. [\[CrossRef\]](#)
64. Shen, Y.; Yang, T.; Wang, J.; Xu, Q.; Li, R.; Pan, W.; Li, G.; Wang, Z.; Tan, J.; Wu, J.; et al. Indomethacin Enhances the Cytotoxicity of Recombinant Human Lymphotoxin α on Tumor Cells by Suppressing NF- κ B Signaling. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1424–1429. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Yadav, S.K.; Adhikary, B.; Chand, S.; Maity, B.; Bandyopadhyay, S.K.; Chattopadhyay, S. Molecular Mechanism of Indomethacin-Induced Gastropathy. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 1175–1187. [\[CrossRef\]](#)
66. Zhao, X.; Wang, T.; Li, N.; Meng, Z.; Wang, W.; Wang, B.; Song, D. Potential Effects of Indomethacin on Alleviating Osteoarthritis Progression in Vitro. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2024**, *24*, 409–419.
67. Hawcroft, G.; D'Amico, M.; Albanese, C.; Markham, A.F.; Pestell, R.G.; Hull, M.A. Indomethacin Induces Differential Expression of β -Catenin, γ -Catenin and T-Cell Factor Target Genes in Human Colorectal Cancer Cells. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 107–114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Dihlmann, S.; Siemann, A.; von Knebel Doeberitz, M. The Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Aspirin and Indomethacin Attenuate Beta-Catenin/TCF-4 Signaling. *Oncogene* **2001**, *20*, 645–653. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Dihlmann, S.; Klein, S.; Doeberitz, M.V.K. Reduction of Beta-Catenin/T-Cell Transcription Factor Signaling by Aspirin and Indomethacin Is Caused by an Increased Stabilization of Phosphorylated Beta-Catenin. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 509–516.
70. Gattinoni, L.; Zhong, X.-S.; Palmer, D.C.; Ji, Y.; Hinrichs, C.S.; Yu, Z.; Wrzesinski, C.; Boni, A.; Cassard, L.; Garvin, L.M.; et al. Wnt Signaling Arrests Effector T Cell Differentiation and Generates CD8⁺ Memory Stem Cells. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 808–813. [\[CrossRef\]](#)
71. Yang, S.; Liu, F.; Wang, Q.J.; Rosenberg, S.A.; Morgan, R.A. The Shedding of CD62L (L-Selectin) Regulates the Acquisition of Lytic Activity in Human Tumor Reactive T Lymphocytes. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22560. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Baaten, B.J.; Li, C.-R.; Bradley, L.M. Multifaceted Regulation of T Cells by CD44. *Commun. Integr. Biol.* **2010**, *3*, 508–512. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Gattinoni, L.; Speiser, D.E.; Lichterfeld, M.; Bonini, C. T Memory Stem Cells in Health and Disease. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 18–27. [\[CrossRef\]](#)

74. Gattinoni, L.; Klebanoff, C.A.; Palmer, D.C.; Wrzesinski, C.; Kerstann, K.; Yu, Z.; Finkelstein, S.E.; Theoret, M.R.; Rosenberg, S.A.; Restifo, N.P. Acquisition of Full Effector Function in Vitro Paradoxically Impairs the in Vivo Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred CD8⁺ T Cells. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 1616–1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Rangel Rivera, G.O.; Knochelmann, H.M.; Dwyer, C.J.; Smith, A.S.; Wyatt, M.M.; Rivera-Reyes, A.M.; Thaxton, J.E.; Paulos, C.M. Fundamentals of T Cell Metabolism and Strategies to Enhance Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 645242. [[CrossRef](#)]
76. Chapman, N.M.; Boothby, M.R.; Chi, H. Metabolic Coordination of T Cell Quiescence and Activation. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 55–70. [[CrossRef](#)]
77. Oberholtzer, N.; Quinn, K.M.; Chakraborty, P.; Mehrotra, S. New Developments in T Cell Immunometabolism and Implications for Cancer Immunotherapy. *Cells* **2022**, *11*, 708. [[CrossRef](#)]
78. Ma, S.; Ming, Y.; Wu, J.; Cui, G. Cellular Metabolism Regulates the Differentiation and Function of T-Cell Subsets. *Cell. Mol. Immunol.* **2024**, *21*, 419–435. [[CrossRef](#)]
79. Shin, B.; Benavides, G.A.; Geng, J.; Korolov, S.B.; Hu, H.; Darley-Usmar, V.M.; Harrington, L.E. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Regulates the Fate Decision between Pathogenic Th17 and Regulatory T Cells. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 1898–1909.e4. [[CrossRef](#)]
80. Chatterjee, S.; Daenthanasanmak, A.; Chakraborty, P.; Wyatt, M.W.; Dhar, P.; Selvam, S.P.; Fu, J.; Zhang, J.; Nguyen, H.; Kang, I.; et al. CD38-NAD⁺ Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 85–100.e8. [[CrossRef](#)]
81. Dwyer, C.J.; Arhontoulis, D.C.; Rangel Rivera, G.O.; Knochelmann, H.M.; Smith, A.S.; Wyatt, M.M.; Rubinstein, M.P.; Atkinson, C.; Thaxton, J.E.; Neskey, D.M.; et al. Ex Vivo Blockade of PI3K Gamma or Delta Signaling Enhances the Anti-tumor Potency of Adoptively Transferred CD8⁺ T Cells. *Eur. J. Immunol.* **2020**, *50*, 1386–1399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Vallée, A.; Guillevin, R.; Vallée, J.-N. Vasculogenesis and Angiogenesis Initiation under Normoxic Conditions through Wnt/ β -Catenin Pathway in Gliomas. *Rev. Neurosci.* **2018**, *29*, 71–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Karmaus, P.W.F.; Chen, X.; Lim, S.A.; Herrada, A.A.; Nguyen, T.-L.M.; Xu, B.; Dhungana, Y.; Rankin, S.; Chen, W.; Rosencrance, C.; et al. Metabolic Heterogeneity Underlies Reciprocal Fates of TH17 Cell Stemness and Plasticity. *Nature* **2019**, *565*, 101–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

A**B**

Supplementary Figure S1

The amount of EpoxyBeads applied to activate CD4⁺ T cells affected cell viability. **(A)** Bar graph showing mean percentage viability of activated canine CD4⁺ T cells 24 h post-stimulation with ConA and different ratios of EpoxyBeads. Data are shown as the mean of 3 dogs ($n=3$), and error bars indicate SEM. Statistical analysis was performed by One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). **(B)** Representative histograms of cell viability after stimulation with different EpoxyBeads to CD4⁺ T cells ratios (FACS Aria II, Becton Dickinson).

Warszawa, 1.10.2025 r.

mgr inż. Iwona Szopa
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

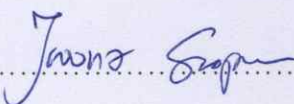
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Majchrzak-Kuligowska K, Pingwara R, Kulka M, Taşdemir M, Gajewska M:
A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype
with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity, *International Journal of Molecular
Sciences*, 2025; 26(10):4946

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i projektu badań, pozyskaniu finansowania i kierowaniu projektem (projekt Preludium Narodowego Centrum Nauki nr 2023/49/N/NZ5/03656), sformułowaniu hipotezy naukowej i określeniu celów badawczych, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu doświadczeń (izolacja PBMC, izolacja limfocytów Th, hodowle komórkowe, aktywacja i różnicowanie limfocytów Th, analiza metodą cytometrii przepływowej: analiza poziomu cząsteczki CD25, syntezy cytokin i poziomu czynników transkrypcyjnych, fenotypu komórek pamięci oraz funkcji mitochondrialnych; analiza metabolizmu komórkowego metodą Seahorse), analizie statystycznej uzyskanych danych, przygotowaniu rycin, interpretacji wyników, opracowaniu tekstu publikacji oraz udzieleniu odpowiedzi na recenzje.



Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

Dr hab. Kinga Majchrzak-Kuligowska
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

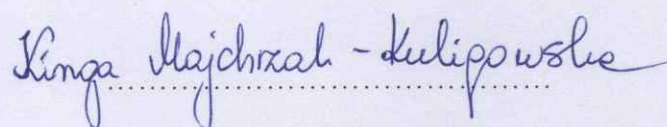
**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Majchrzak-Kuligowska K, Pingwara R, Kulka M, Taşdemir M, Gajewska M:
A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype
with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity, *International Journal of Molecular
Sciences*, 2025; 26(10):4946

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i projektu badań,
pozyskaniu finansowania (projekt Fundacji na rzecz Nauki Polskiej nr POIR.04.04.00-00-
3EE9/17-00), opiece merytorycznej i kierowaniu projektem.



Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

mgr Rafał Pingwara
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Majchrzak-Kuligowska K, Pingwara R, Kulka M, Taşdemir M, Gajewska M:
A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype
with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity, *International Journal of Molecular
Sciences*, 2025; 26(10):4946

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestnictwie w przeprowadzeniu
doświadczeń (izolacja PBMC, hodowle komórkowe).

.....
Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

Dr Marek Kulka
Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Majchrzak-Kuligowska K, Pingwara R, Kulka M, Taşdemir M, Gajewska M:
A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype
with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity, *International Journal of Molecular
Sciences*, 2025; 26(10):4946

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestnictwie w przeprowadzeniu
doświadczeń (izolacja PBMC, hodowle komórkowe) oraz redakcji tekstu publikacji.

.....

Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

mgr Monika Taşdemir
Szkoła Doktorska
Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Majchrzak-Kuligowska K, Pingwara R, Kulka M, Taşdemir M, Gajewska M:
A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype
with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity, *International Journal of Molecular
Sciences*, 2025; 26(10):4946

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na uczestnictwie w przeprowadzeniu
doświadczeń (izolacja PBMC, hodowle komórkowe, aktywacja limfocytów Th).



.....
Podpis

Warszawa, 1.10.2025 r.

Dr hab. Małgorzata Gajewska, prof. SGGW
Katedra Nauk Fizjologicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Rada Dyscypliny Weterynaria
Szkoly Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

Szopa IM, Majchrzak-Kuligowska K, Pingwara R, Kulka M, Taşdemir M, Gajewska M:
A New Method of Canine CD4⁺ T Lymphocyte Differentiation Towards the Th17 Phenotype
with Analysis of Properties and Mitochondrial Activity, *International Journal of Molecular
Sciences*, 2025; 26(10):4946

mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opiece merytorycznej, analizie
statystycznej uzyskanych danych, redakcji tekstu publikacji oraz nadzorze merytorycznym
przy udzielaniu odpowiedzi na recenzje.



Podpis