

TGF- β MERUPAKAN MEDIATOR IMUNOSUPRESI DARI SEL T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ IN VITRO

TGF- β IS MEDIATOR OF IMMUNO-SUPPRESSION OF CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T CELLS IN VITRO

Agustina Tri Endharti

Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

Naturally the existency of regulatory T cells are represented by CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells. Those cells have been identified as a population of immuno-regulatory T cells, which mediated suppression of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells by cell-cell contact. In the effectors phase the function of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T regulatory T cells through the involvement of certain suppressive cytokines, such as TGF- β . In this study, we demonstrated that CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ cells produced high levels of Transforming Growth Factor- β (TGF- β) compared with CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T cells when stimulated by plate-bound anti-CD3 and soluble anti-CD28. We observed that suppression ability of those cells could be abolished by the presence of anti-TGF- β . Finally, we found that stimulated CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells but not CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ T cells express high and persistent levels of TGF- β . This finding strongly suggests that CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells exert immuno-suppression by cell-cell surfaces interaction involved cell of TGF- β .

Keyword: Sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$, TGF- β , immunosupresion

PENDAHULUAN

Salah satu subset sel T CD4 $^{+}$ yang berasal dari organ timus yang dapat mengekspresikan CD25 dan memiliki ikatan α (α -chain) pada IL-2 reseptornya, mampu mempertahankan reaksi respon imun terhadap penyakit autoimun. Hal ini terjadi karena sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ merupakan sel supresor profesional yang memiliki mekanisme melalui sel-sel kontak (*contact-dependent mechanism*)(1). *Self reactive* dari sel T memiliki salah satu potensi sebagai penyebab penyakit autoimun. Sel T yang mengalami aktifasi tersebut dapat dicegah dengan adanya sel T supresor. Mekanisme untuk mempelajari karakteristik supresor yang berasal dari subset sel T (*T-cell subsets*) adalah melalui sel T regulator (1,2,3,4).

Pada mencit dewasa, kurang lebih 5–10% dari sel T tersebut tidak distimulasi oleh sel T CD4 untuk dapat mengekspresikan CD25, yang berikatan dengan *Interleukin-2 Receptor* (IL-2R). Penelitian yang dilakukan dengan cara mengambil timus melalui operasi (*thymectomy*) menunjukkan bahwa mencit pada hari ke-3 mengalami eliminasi pada sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$. Hal ini bisa terjadi pada beberapa penyakit autoimun seperti orchitis, oophoritis, dan thyroiditis (5,6,7). Pada neonatus mencit yang mengalami thymectomy, sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ dapat mencegah perkembangan penyakit autoimun (8,9,10). Salah satu kemungkinan dari imunosupresi disebabkan oleh sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$, karena sel T tersebut dapat menghasilkan IL-10 atau TGF β . Hal ini dibuktikan dengan studi transfer sel bahwa IL-10 antibodi dan TGF β antibody dapat memblok

aktivitas supresor pada sel transfer (11,12,13). Sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ yang dikokultur dengan CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ dan APC dengan penambahan anti-CD3 mengakibatkan supresi dari sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (14,15,16). Tetapi penyebab/mediator dari supresi ini belum diketahui.

Berdasarkan latar belakang di atas maka dalam penelitian ini dibuktikan adanya mediator supresi dari sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ terhadap sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$.

METODE

Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan mencit betina C57BL/6 umur 6–8 minggu sebanyak 30 ekor yang diperoleh dan dipelihara di *Laboratory of Animal Center* di Nagoya University. Hewan coba dipelihara dalam ruangan yang steril, bersih, kondisi lingkungan yang sesuai dengan kebutuhan mencit untuk hidup (suhu, kelembaban ventilasi dan penerangan yang cukup) serta dilakukan pengecekan dan pengontrolan terhadap kondisi hewan coba oleh staf dari *Laboratory of Animal Center* di Nagoya University secara rutin. Penggantian sekam dilakukan 2 hari sekali. Masing-masing kandang berisi 4 ekor mencit.

Prosedur Penelitian

Pembedahan Mencit

Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dimatikan dulu dengan cara dianastesi menggunakan eter. Prosedur secara singkat adalah kapas dibasahi dengan eter, kemudian diletakkan dalam kaleng tertutup. Mencit yang akan dibunuh dimasukkan dalam kaleng yang sudah berisi kapas yang mengandung eter. Kaleng ditutup kurang lebih selama 1 menit. Setelah itu mencit siap dibedah.

Analisis Menggunakan *Flow Cytometry* berdasarkan metode Schimpl (2000)

Sel T limfosit 1×10^6 dilabel dengan monoklonal antibodi selama 20 menit pada suhu 4°C , kemudian sel ditambahkan ke dalam larutan PBS yang mengandung 1% FBS sebanyak 500 μl , selanjutnya dianalisis dengan *flow cytometry* (FACS Calibur, Beckton Dickinson, San Jose, CA) dan menggunakan *CELL QUEST software* (Beckton Dickinson). Monoklonal antibodi yang digunakan adalah *anti mouse anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen (CTLA) PE-conjugated*, *anti mouse anti CD4 mAb (UC10-4F10-11) FITC-conjugated*, *anti mouse anti-CD25 mAb FITC-conjugated (7D4)*, *PE-conjugated anti-CD25 mAb (PC61)*, *FITC-conjugated anti mouse anti-CD80 mAb PE-conjugated (16-10A1)*, *biotin-conjugated mice anti TGF- β (12-23B6)*, *PE-conjugated mice IgG (145-2C12)* bahan-bahan di atas diproduksi oleh BD PharMingen. *Magnetic beads* yang diproduksi dari Miltenyi Biotec (USA). Total sel limfosit yang dianalisis adalah 10.000 sel pada masing-masing sampel.

Bahan untuk kultur Sel

Medium kultur yang digunakan dalam penelitian: RPMI1640 (Sigma-Aldrich), 10% FCS (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 10mM Hepes (pH 7.0) (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate, L-glutamine dan 50 μM 2-ME (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

Bahan antibodi

Mouse anti-CD3 mAb (145-2C11), mouse anti-CD28 mAb (37.51), mouse anti-TGF β mAb (clone 1D11) dan Rat anti-mouse IL-10 mAb (clone JES052A5) bahan-bahan di atas diproduksi oleh R&D Systems.

Isolasi sel limfosit dari organ limfa mencit

Isolasi sel limfosit dari organ limfa mencit dilakukan berdasarkan metode dari Asano (1996) limfa diisolasi dari mencit c57bl/6, limfa dicuci dengan medium rpmi untuk membersihkan eritrosit yang menempel. Limfa diletakkan pada cawan petri steril dengan menambahkan medium rpmi yang mengandung 10% fbs (medium tumbuh), lalu dihancurkan perlahan dengan menggunakan ujung bagian belakang dari spuit. setelah itu dilakukan sentrifugasi 1500 rpm, 5 menit, 4°C . Supernatant yang diperoleh dari hasil sentrifugasi dibuang, agar presipitan yang diperoleh tidak mengandung eritrosit, maka ditambahkan RBC lysis buffer (Na_2HPO_4 0,2M; KH_2PO_4 5M; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01M; NaHCO_3 0,2M) pada presipitan. selanjutnya proses sentrifugasi diulangi lagi. Tahap yang terakhir adalah pencucian sel dengan menambahkan medium tumbuh dilanjutkan dengan sentrifuge 1500 rpm, 5 menit, 4°C .

Purifikasi sel T CD4 $^+$ CD25 $^-$ dan CD4 $^+$ CD25 $^+$

Sel T CD4 $^+$ CD25 $^-$ dan CD4 $^+$ CD25 $^+$ diisolasi dari organ limfa menggunakan FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) berdasarkan metode dari Takahashi (1998). Untuk isolasi sel T CD4 $^+$ CD25 $^-$ dan CD4 $^+$ CD25 $^+$ dengan menggunakan sel sorting, hasil sel yang telah disorting adalah sel T CD4 $^+$ dilabel menggunakan FITC-conjugated anti-CD25 atau PE-conjugated anti-CD25. Sel CD25-positif (CD25 $^+$) dan CD25 negatif (CD25 $^-$) disorting menggunakan FACS Vantage cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Tingkat kemurnian sel T CD4 $^+$ CD25 $^-$ maupun CD4 $^+$ CD25 $^+$ yang dihasilkan menggunakan cell sorter mencapai lebih dari 96%.

Produksi Sitokin dari CD4 $^+$ CD25 $^+$ diukur dengan ELISA

Sel T CD4 $^+$ CD25 $^-$ atau CD4 $^+$ CD25 $^+$ masing-masing sebanyak 1×10^5 sel ditumbuhkan dalam *culture plate well* 96. Masing-masing sel T dibuat 5 kelompok perlakuan untuk mengetahui perbedaan stimulasi pada sel T. *Culture plate* sebelumnya *dicoating* dengan menggunakan anti-CD3 mAb (145-2C11, Pharmingen) (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (kelompok 1), anti-CD3 mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) +anti-CD28 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (kelompok 2), anti-CD3 mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) +IL-2 (20 U/ml) (kelompok 3) dan anti-CD3 mAb (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) +anti-CD28 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + IL-2 (20 U/ml) (kelompok 4) dan culture plate tanpa dicoating. Sel T dikultur dalam *culture plate* selama 72 jam pada suhu 37°C . Selanjutnya sitokin yang dihasilkan dari supernatant diukur dengan ELISA kits TGF β dan IL-10 R&D systems (Minneapolis, MN). Absorbansi diukur pada 450 nm menggunakan *microplate* ELISA reader (MR 5000 Dynatech).

Ekspresi CTLA-4 pada sel T CD4 $^+$ CD25 $^+$ atau CD4 $^+$ CD25 $^-$

Sel T limfosit yang diisolasi dari jaringan limfa diinkubasi dengan anti-CD16 pada 4°C selama 15 menit. Kemudian dicuci dengan PBS, selanjutnya distaining dengan PE-conjugated anti-CTLA-4 atau PE-conjugated control hamster IgG pada 37°C selama 2 jam. Setelah diinkubasi, sel distaining dengan FITC-conjugated anti-CD25 dan Cy-Chrome™-conjugated anti-CD4 pada 4°C selama 20 menit. Selanjutnya sel dicuci kembali dengan PBS dan dianalisis dengan *flow cytometry* FACS Calibur (Becton Dickinson)

HASIL PENELITIAN

Profil Sitokin yang dihasilkan oleh sel T CD4 $^+$ CD25 $^+$ dan CD4 $^+$ CD25 $^-$

Kemampuan sel T CD4 $^+$ CD25 $^-$ dan CD4 $^+$ CD25 $^+$ untuk menghasilkan sitokin, ditunjukkan dalam gambar 1A. Kadar TGB- β paling tinggi didapatkan pada sel T CD4 $^+$ CD25 $^+$ yang distimulasi dengan pre-coated anti-CD3 *plate well*, dengan penambahan anti-CD28 dan IL-2 (7500pg/ml), jika dibandingkan dengan sel T CD4 $^+$ CD25 $^-$ yang distimulasi

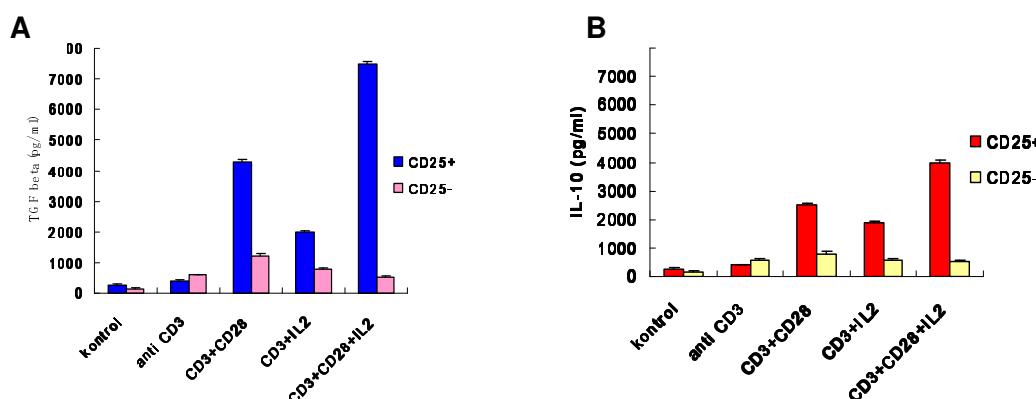
dengan pre-coated anti-CD3 dan penambahan anti-CD28 (4600pg/ml), atau yang distimulasi dengan pre-coated anti-CD3 dan IL-2 (2400pg/ml). Kadar TGB- β yang rendah didapatkan pada sel T CD4+CD25- yang dikultur pada ketiga perlakuan di atas. Kadar TGB- β sangat rendah pada sel T CD4+CD25+ maupun CD4+CD25+ yang hanya distimulasi dengan pre-coated anti-CD3 saja. Kadar TGB- β paling rendah pada kedua sel T tanpa distimulasi apapun (kontrol). Pada gambar 1B, selain menghasilkan TGB- β , ternyata dengan perlakuan kultur yang sama, sel T CD4+CD25+ juga menghasilkan IL-10, walaupun kadarnya lebih rendah jika dibandingkan dengan TGB- β .

Hasil pada Gambar 1 menunjukkan bahwa sel T CD4+CD25+ setelah distimulasi dengan pre-coated anti-CD3 *plate well* dengan soluble anti-CD28 dan IL-2, menghasilkan sitokin dengan kadar TGB- β yang tertinggi (7600 pg/ml).

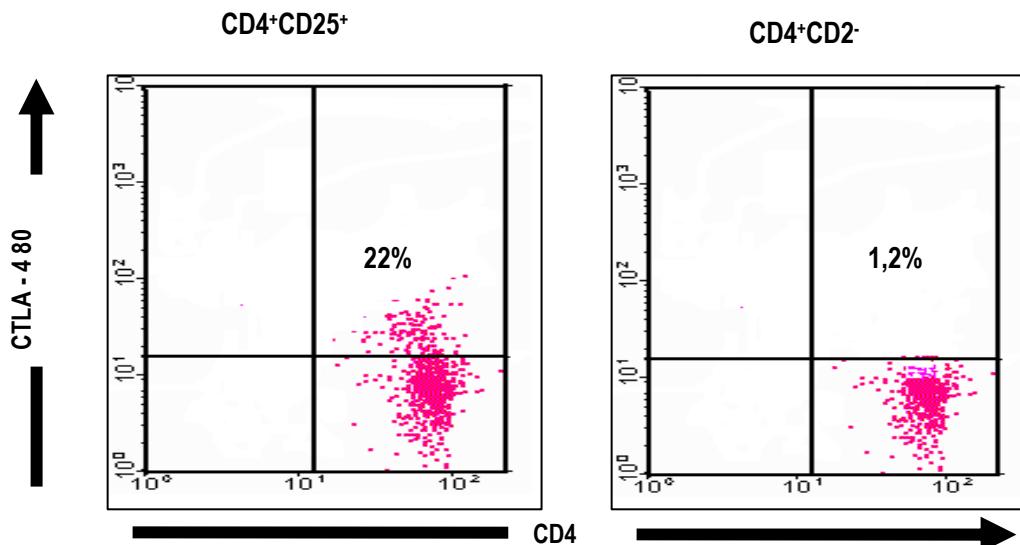
Kadar ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan kadar IL-10 yang dihasilkan oleh sel T CD4+CD25- yang distimulasi dengan cara yang sama.

Sel T CD4+CD25+ kostimulasi melalui CTLA-4 dalam meningkatkan produksi TGF- β

Dalam penelitian ini dibuktikan keterlibatan CTLA-4 *signaling pathway* dalam menghasilkan TGF- β dari sel T CD4+CD25+. Sel T CD4+CD25- maupun CD4+CD25+ distimulasi dengan pre-coated anti-CD3 dan IL-2 selama 72 jam, kemudian dilabel menggunakan *monoclonal antibody* terhadap anti CTLA-4 sesuai dengan material dan metode. Dari hasil analisis menggunakan *flow cytometry* (Gambar 2) menunjukkan bahwa ekspresi CTLA-4 dari sel T CD4+CD25+ (22%), sedangkan sel T CD4+CD25- 1,2%.



Gambar1. Sel T 1×10^5 sel CD4+CD25- atau CD4+CD25+ distimulasi dengan pre-coated anti-CD3 Ab (10 μ g/ml), dengan atau tanpa soluble anti-CD28 Ab (2 μ g/ml) atau eksogenus IL-2 (20 U/ml), total volume sebanyak 100 μ l/well, dikultur selama 48 jam. Kadar TGF- β (1A) dan IL-10 (1B) dari kultur supernatant diukur menggunakan ELISA-kit (R&D System).

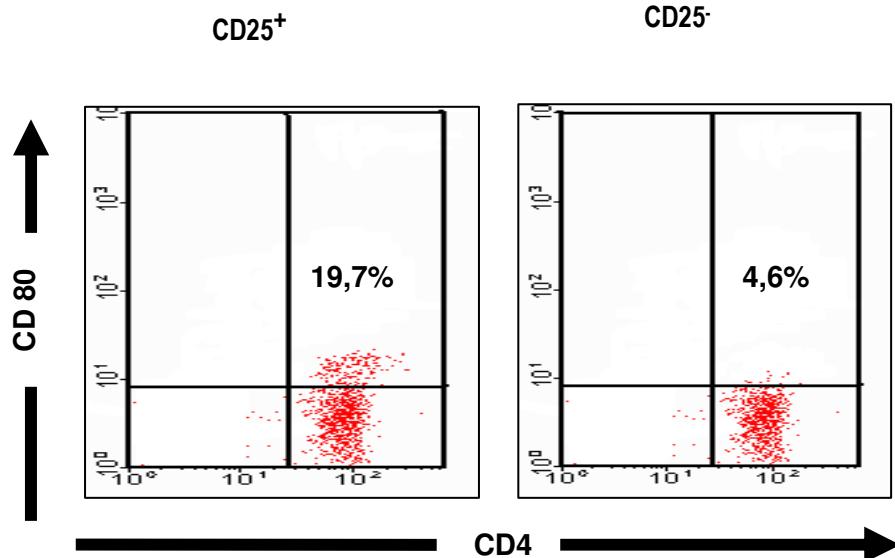


Gambar 2. Sel T CD4+ CD25+ dan CD4+ CD25- distimulasi dengan anti CD3 (20 μ g/ml) dan IL-2 (20 U/ml) selama 72 jam, kemudian dilabel menggunakan *monoclonal antibody* terhadap anti CTLA-4 Conjugated terhadap fluorescein isothiocyanate (FITC) dan terhadap anti CD4 Conjugated terhadap phycoerithrin (PE)

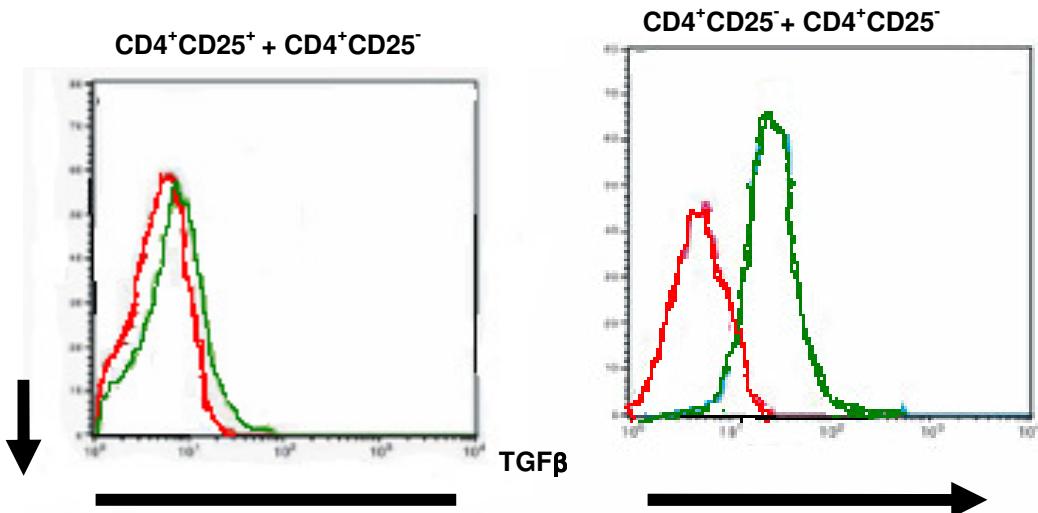
Dalam penelitian ini diperoleh hasil bahwa CTLA-4 terlibat dalam peningkatan produksi TGF- β melalui *signaling pathway* yang dihasilkan oleh sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Alegre (1996), bahwa *crosslinking* dari CTLA-4 dapat meningkatkan produksi TGF- β melalui sel T CD4 (17).

Sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ mengekspresikan CD80 sebagai ligands dari CTLA-4

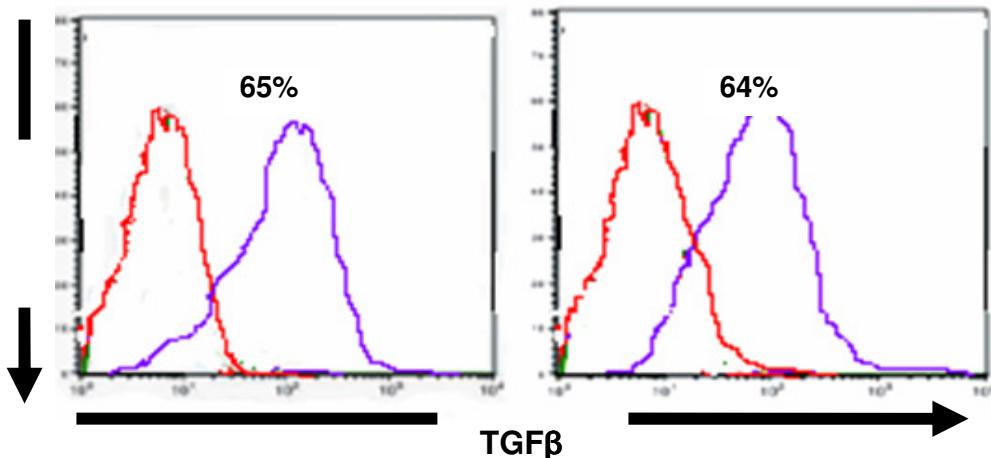
Setelah mengalami stimulasi dengan pre-coated anti-CD3 plate well dan anti-CD28 serta IL-2, sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ dapat mengekspresikan CD80 lebih tinggi (19,7%) dibandingkan sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (4,6%). CD80 yang merupakan ligand dari CTLA-4, hal ini membuktikan adanya kostimulasi signal dengan sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$



Gambar 3. Sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ distimulasi dengan anti CD3 (20 μ g/ml) dan IL-2 (20 U/ml) selama 72 jam, kemudian dilabel menggunakan *monoclonal antibody* terhadap anti CD80 Conjugated terhadap fluorescein isothiocyanate (FITC) dan terhadap anti CD4 Conjugated terhadap phycoerithrin (PE)



Gambar 4. Sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (1x10⁵) +CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (4x10⁵) atau CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (1x10⁵)+CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (4x10⁵) kokultur selama 72 jam, staining dengan FITC-conjugated, anti mouse anti CD4 mAb dan staining dengan biotin-conjugated mice anti TGF- β atau PE-conjugated mice IgG. Sel T CD4 $^{+}$ yang mengekspresikan TGF- β (garis hijau) sedangkan mice IgG (garis merah).



Gambar 5. Sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (1×10^5) +CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (4×10^5) atau CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (1×10^5)+CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (4×10^5) kokultur selama 72 jam dengan penambahan anti TGF- β , distaining dengan FITC-conjugated, anti mouse anti CD4 mAb dan distaining dengan biotin-conjugated mice anti TGF- β dan PE-conjugated mice IgG. Sel T CD4 $^{+}$ yang mengekspresikan TGF- β (garis ungu) sedangkan mice IgG (garis merah).

Sel-sel kontak diperlukan oleh sel-sel T supresi CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$

Sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ di kokultur dengan sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ melalui cara distimulasi dengan anti CD3 , soluble anti CD28 dan IL-2. Selanjutnya, timbul pertanyaan apakah imunosupresi dari sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ diperantara oleh TGF- β ? Untuk menjawab pertanyaan tersebut sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ atau CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ distaining dengan FITC conjugated anti-CD4 dan yang lain staining dengan biotin-conjugated mice anti-TGF- β atau PE -conjugated mice IgG. Pada gambar 4 ditunjukkan bahwa ekspresi TGF- β pada sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ setelah distimulasi dengan anti CD3, anti CD28 dan IL-2 setelah staining dengan biotin-conjugated mice anti-TGF- β menunjukkan penurunan produksi TGF- β , yaitu hanya 11% sedangkan sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ mencapai 62%. Sebagai kontrol, sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ atau sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ distaining menggunakan PE -conjugated mice IgG, menunjukkan ekspresi TGF- β pada sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ atau CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (garis merah) tidak ada perbedaan.

Anti TGF- β menetralisasi kemampuan supresi dari sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$

Untuk mendukung hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa kemampuan imunosupresi dari sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ memang diperantara oleh TGF- β , maka hal ini dibuktikan dengan cara kokultur sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ dan sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ atau sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ dan CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ distimulasi dengan anti CD3 , soluble anti CD28 dan IL-2, dan untuk menetralisasi kemampuan supresi TGF- β , ditambahkan monoclonal anti TGF- β antibodi (10ng/ml) (R&D System) pada kultur selnya. Setelah 72 jam, sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ atau CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ distaining dengan FITC-

conjugated, anti mouse anti CD4 mAb dan yang lain staining dengan biotin-conjugated mice anti-TGF- β atau PE-conjugated mice IgG. Pada gambar 5 ditunjukkan bahwa ekspresi TGF- β pada sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ setelah distimulasi dengan anti CD3, anti CD28 dan IL-2, menunjukkan TGF- β positif yaitu 65% sedangkan sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ TGF- β 64%.(garis ungu) , sedangkan pada kontrol IgG ekspresi TGF- β pada sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ atau CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ (garis merah) tidak ada perbedaan.

DISKUSI

Dalam penelitian ini dibuktikan bahwa TGF- β diproduksi oleh sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ yang distimulasi dengan cara pre-coated menggunakan anti CD3, soluble-CD28 dan IL-2 (gambar 1).

Peningkatan produksi TGF- β diduga diperantara oleh signal dari CTLA-4. Sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ dilaporkan memiliki fungsi efektor yang diperantara oleh signal CTLA-4 secara *in vitro* dan *in vivo* (18,19,20). Hal ini dapat diketahui dari hasil penelitian bahwa CTLA-4 merupakan regulator terhadap respon imun dan dalam meningkatkan produksi TGF- β melalui sel T CD4 (21,22,23). Dalam penelitian sebelumnya telah ditentukan ekspresi CTLA-4 secara intraseluler dari sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (gambar1) dan melalui sel-sel permukaan (sel kontak) (gambar 4). Chen (1998) menunjukkan bahwa anti-CTLA-4 meningkatkan produksi TGF- β melalui sel T CD4 naive mencit (24). Fakta di atas membuktikan keterlibatan *signaling pathway* dari CTLA-4 dalam memproduksi TGF- β oleh sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$.

TGF- β akan dihasilkan pada saat sel-sel T distimulasi dengan anti CD3, anti CD28 dan IL-2 dan CTLA-4, kondisi stimulasi tersebut dapat terjadi secara *in vitro* dengan adanya respon imun. Sedangkan produksi TGF- β diperoleh

melalui ikatan dengan sel-sel permukaan, yaitu melalui Antigen Presenting Cell (APC) (25,26,27,28). Hal ini menunjukkan bahwa TGF- β memperantara fungsi supresi oleh sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ (gambar 4). Untuk membuktikan kemampuan supresi ini berasal dari produksi TGF- β , maka kondisi tersebut dihambat dengan anti TGF- β mAb (gambar 5), bahwa dengan penambahan anti TGF- β mAb pada kultur sel menunjukkan bahwa kemampuan supresor dari sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ dapat dinetralisasi. Data pada gambar 5 menunjukkan bahwa dengan penambahan anti TGF- β mAb pada kokultur sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ dan sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ menghilangkan fungsi supresor dari sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$, sedangkan sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ karena tidak menghasilkan TGF- β maka tidak ada perbedaan pada perlakuan dengan atau tanpa penambahan anti TGF- β . Hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa fungsi imunosupresor dari sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ diperantarai

oleh sel-sel permukaan yang berikatan dengan TGF- β . Data penelitian ini membuktikan peranan TGF- β sebagai sitokin yang dihasilkan oleh sel-sel T supresor sebagai perantara dalam mekanisme sel-sel kontak.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa sel-sel T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ memiliki fungsi imunosupresor melalui interaksi sel-sel yang terlibat dalam permukaan selnya yang diperantarai oleh TGF- β .

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Izumi Nakashima dan Haruhiko Suzuki, MD.,Ph.D dari Department of Immunology, Nagoya University, Japan atas diskusi dan saran selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Sakaguchi, S. *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. *Cell*.2000;101:455–458.
2. Powrie, F., M.W. Leach, S.Mauze, L.B. Caddle, and R.L.Coffman. *Phenotypically distinct subsets of CD4 $^{+}$ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 SCID mice*. *Int. Immunol.* 2000; 5:1461–1471.
3. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie.. *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25 $^{+}$ CD4 $^{+}$ regulatory cells that control intestinal inflammation*. *J. Exp. Med.* 2000;192:295–302.
4. Asseman, C., S. Mauze, M.W. Leach, R.L. Coffman, and F.Powrie. *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. *J. Exp. Med.* 2001;190:995–1004.
5. Neurath, M.F., I. Fuss, B.L. Kelsall, D.H. Presky, W. Waegell, and W. Strober.. *Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance*. *J. Exp. Med.* 1999;183:2605–2616.
6. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. *CD4 T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. *Nature*.1997;389:737–742.
7. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi.. *Immunologic self-tolerance maintained by CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. *Int. Immunol.* 1998;10:1969–1980.
8. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. *CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. *J. Exp. Med.* 1998;188:287–296.
9. Kitani, A., I.J. Fuss, K. Nakamura, O.M. Schwartz, T. Usui, and W. Strober. *Treatment of experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 plasmid: TGFbeta1 mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukin (IL)-10 induction and IL-12 receptor beta2 chain down regulation*. *J. Exp. Med.* 2000;192:41–52.
10. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. *Immuno-Shevach EM: Certified professionals: CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ suppressor T cells*. *J Exp Med* 2001, 193:41-46.
11. Asano M, Toda M, Sakaguchi N and Sakaguchi S. *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. *J. Exp. Med.* 1996. 184: 387-396.
12. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. *Identification and functional characterization of human CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. *J Exp Med* 2001, 193:1285-1294.
13. Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S: *Naturally anergic and suppressive CD25 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation*. *Int Immunol* 2000, 12:1145-1155.
14. Shevach EM: *Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 2000, 18:423-449.
15. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA: *A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatory T cells from human peripheral blood*. *J Immunol* 2001, 166:7282-7289.
16. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG: *Human CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function*. *J Exp Med* 2001, 193:1295-1302.

17. Alegre, M.L., P.J. Noel, B.J. Eisfelder, E. Chuang, M.R. Clark, S.L. Reiner, and C.B. Thompson. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on mouse T cells. *J. Immunol.* 1996;157:4762–4770.
18. Piccirillo CA, Shevach EM: Cutting edge: control of CD8 $^{+}$ T cell activation by CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 2001, 167:1137-1140.
19. Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux, T.C. Barbosa, A. Cumano, and A. Bandeira. CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* 2001;166:3008–3018.
20. Krummel, M.F., and J.P. Allison. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* 1996;183:2533–2540.
21. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. Suppressor effector function of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ immuno-regulatory T cells is antigen non specific. *J. Immunol.* 2000;164:183–190.
22. Kuniyasu, Y., T. Takahashi, M. Itoh, J. Shimizu, G. Toda and S. Sakaguchi. Naturally anergic and suppressive CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ T cells as a functionally and phenotypically distinct immuno-regulatory T cell sub population. *Int. Immunol.* 2000;12:1145–1155.
23. Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 co-stimulation is essential for the homeostasis of the CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ immuno-regulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12:431–440.
24. Chen, W., W. Jin, and S.M. Wahl. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4 $^{+}$ T cells. *J. Exp. Med.* 1998;188:1849–1857.
25. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T: Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 1999, 161:72-87.
26. Marcelletti, J.F., and D.H. Katz. IL-10 stimulates murine antigen-driven antibody responses in vitro by regulating helper cell subset participation. *Cell Immunol.* 1996;167:86–98.
27. Crawford, S.E., V. Stellmach, J.E. Murphy-Ullrich, S.M. Ribeiro, J. Lawler, R.O. Hynes, G.P. Boivin, and N. Bouck. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell.* 1998; 93:1159–1170.
28. Papiernik, M., M.L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, and C. Penit. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int. Immunol.* 1998; 10:371–378.