



DERLEME / REVIEW

Multipl miyelom'da CD4+ regülatör T hücrelerin rolü

Role of CD4+ regulatory T cells in multiple myeloma

Deniz Ekinci¹, Aysun Özkan²

¹Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Turkey

²Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Turkey

Cukurova Medical Journal 2017;42(3):546-551.

Abstract

In many studies, regulatory T cell increase is seen both in patients with newly diagnosed multiple myeloma and post chemotherapy patients including autologous stem cell transplants. Multiple myeloma is a malignant plasma cell disease. Regulatory T cells have a role in immune homeostasis from cancer and inflammatory conditions to autoimmune diseases. PD-1 pathway stimulates T cell population towards regulatory T cell development. It has been shown that PDL1 plays an important role in differentiating inducible regulatory T cells. Recently, at least six clinical studies targeting PDL1 or PD-1 on multiple myeloma have been started. In accordance with the current literature, we suggest that patients with myeloma can benefit anti PD-1/PDL1 therapy.

Key words: Multiple myeloma, regulatory T cells, PD-1/PDL1-PDL2.

Öz

Yapılan pek çok araştırmada hem yeni tanı multipl miyelomda hem de olog kök hücre nakli dahil kemoterapötik tedaviler sonrası hastalarda regülatör T hücrelerin artışı söz konusudur. Multipl miyelom habis bir plazma hücre hastalığıdır. Regülatör T hücreleri kanser ve inflamatuvar koşullardan otoimmün hastalıklara kadar immün homeostazide rol oynar. PD-1 yolu yardımcı T hücre popülasyonunu regülatör T hücre gelişimi yönünde uyarmaktadır. PDL1'in indüklenebilir regülatör T hücrelerin farklılaştırılmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Son zamanlarda multipl miyelomda PDL1 veya PD-1'i hedef alan en az altı klinik çalışma başlatılmıştır. Mevcut literatüre göre miyelom hastalarının anti PD-1/PDL1 tedavisinden fayda sağlayabileceğini önermekteyiz.

Anahtar kelimeler: Multipl miyelom, regülatör T hücreler, PD-1/PDL1-PDL2.

GİRİŞ

Multipl miyelom tüm hematolojik kanserlerin yaklaşık % 10'unu oluşturan malign bir plazma hücresi hastalığıdır. Lenfomadan sonra en yaygın ikinci hematolojik malignitedir. Genellikle "belirlenemeyen monoklonal gamopati (Monoclonal gammopathy of undetermined significance)" (MGUS) olarak adlandırılan klonal plazma hücre çoğalmasının asemptomatik premalign aşamasından gelişir. MGUS elli yaşın üzerindeki nüfusun % 3'ünden fazlasında bulunur ve miyeloma veya ilgili maligniteye yılda % 1 oranında ilerleme kaydeder. Bazı hastalarda semptomatik olmayan ancak daha ileri premalign bir evre olan "asemptomatik (smoldering) multipl miyelom" (SMM) olarak

adlandırılan klinik bulgular bilinmektedir¹. Multipl miyelom tipik olarak kemik iliğinde atipik klonal plazma hücrelerinin %10'un üzerinde infiltrasyonu, serum ve/veya idrarda monoklonal protein ve CRAB semptomları (hiperkalsemi, renal yetmezlik, anemi ve kemik lezyonları) ile karakterizedir^{2,3}. Monoklonal protein aynı zamanda tümör yükünü ölçen önemli bir laboratuvar bulgusudur^{4,5}. Bunların yanında beta 2 mikroglobulin (β 2 MG), c-reaktif protein (CRP) ve laktik dehidrogenaz (LDH) prognostik değer taşıyan önemli laboratuvar bulgularıdır⁶.

İmmünofenotipik değerlendirme multipl miyelomda tanı için çok değerli veri sağlamaktadır. İmmünohistokimya ve akış sitometri metodları değerlendirme amaçlı kullanılmaktadır. Fakat rutinde

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Aysun Özkan, Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya, Türkiye E-mail: aozkan@akdeniz.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 08.02.2017 Kabul tarihi/Accepted: 16.03.2017

daha çok akış sitometri metodu kullanılmaktadır. Multipl miyelomda akış sitometri ile değerlendirmede CD38, CD138 antikorlarının pozitifliği, CD19 negatifliği ve CD56 aberran pozitifliği görülür. CD56 negatifliği lösemik transformasyon ihtimalinin daha yüksek görülmesi nedeniyle olumsuz prognostik faktördür⁷. Miyelom hastalarının karakteristik özelliği monoklonal proteinin üretilmesi ve bunun kan ve/veya idrara salınmasıdır. Monoklonal proteinin varlığı serum ve idrar protein elektroforezi yöntemi ile ortaya çıkarılır. Monoklonal protein ya bir immünglobulindir ya da bir immünglobulin parçasıdır. Miyelom hücrelerinde immünglobulin üretiminden sorumlu genlerde bir ya da daha fazla mutasyon meydana gelmektedir. Multipl miyelomda saptanan genetik anormalliklerin başlıcaları 1., 13., 14. ve 17. kromozomlarda gözlemlenmektedir. Hastaların yarısından fazlasında immünglobulin ağır zincir lokusunu ilgilendiren kromozomda (14q32) translokasyonlar görülmektedir. P53 geninde (17p13) meydana gelen mutasyonlar da hastalarda görülen genetik anormallikler arasındadır⁶.

Multipl miyelomda kemoterapi kombinasyonları ve yüksek doz melfalan tedavisi hastaların sağ kalım oranlarını artırmıştır. Ancak neredeyse tüm hastalarda tam yanıt elde edilenlerde dahil hastalık nüksü kaçınılmazdır. Henüz küratif bir tedavi geliştirilememiştir.

PD-1 (CD279, programlanmış ölüm-1) ve ligandlarına yönelik yeni ajanların keşfi, regülatör T hücrelerinde PD-1 yolağının önemi ve de multipl miyelomda bu alanda yoğunluğu artarak devam eden araştırmaların varlığı bizleri mevcut literatürle ilgili bir derleme yapmaya itmiştir.

REGÜLATÖR T HÜCRELER

Periferik kandaki CD4⁺ hücrelerin %5-10 kadarı regülatör T hücreleridir. Kısaca Treg hücreleri olarak adlandırılır. Treg hücreleri immün homeostazinin sağlanmasında kanserde dahil inflamasyonda ve otoimmün hastalıklarda önemli rol oynar^{8,9}. Alerjik hastalıklarda regülatör T hücrelerden salgılanan IL-10 ve TGF-β'nın IgE'yi baskılamak, IgG4 ve IgA yapımını artırdığı gösterilmiştir. Periferik toleransı IL-10 aracılı olan arıcılar ve kronik helmint infeksiyonu olan hastalarda antijen spesifik IgG4 miktarlarının 100-1000 kat arttığı saptanmıştır^{10,11}.

İki majör Treg popülasyonu vardır. Natural Treg hücreleri (n Treg) timusta gelişir ve özellikle self antijenlere karşı periferik toleransın aktif mekanizmalarının kritik kolunu oluşturur. Natural Treg hücreleri başlıca CD25 (interlökin-2 reseptörü), "Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family-Related Gene" (GITR), "Cytotoxic T Lymphocyte Associated 4" (CTLA-4) ve "forkhead winged helix P3" (FoxP3) moleküllerini ifade ederler. FoxP3 CD4⁺CD25⁺ natural Treg hücrelerinin gelişimi ve işlevi için çok önemli bir role sahiptir. FoxP3, Treglerin aktivasyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Treg biyolojisinde FoxP3 geninin öneminin keşfi ile birlikte natural Tregler hakkındaki bilgilerimiz dahada artmıştır. Farelerde hem timus hem de periferdeki CD4⁺CD25⁺ T hücre popülasyonunda yüksek şekilde ifade edilir ve ifadesi T hücre aktivasyonundan bağımsızdır. FoxP3, periferik CD4⁺CD25⁺ T hücreler ve CD4⁺CD25⁺CD8⁻ timositler tarafından ifade edilir. İnsanlarda ve farelerde CD8⁺ T hücrelerin ve CD25⁻ T hücrelerin çok küçük kısmının FoxP3 ifade ettiği gösterilmiştir¹²⁻¹⁵. İnterlökin-2 baskılama fonksiyonu için gereklidir. Bu durum CD25'in bu hücrelerde fonksiyonel bir rolü olduğunu işaret eder¹⁶. İkincisi indüklenmiş Treglerdir (iTreg). Bu hücreler konvansiyonel CD4⁺ T hücrelerinden kökenlenir. CD4⁺ T hücreleri IL-10 ile indüklenir ve FoxP3 ifade eden IL-10 ve TGFβ salgılayan Treglere dönüşür. CD25 hücre yüzey belirteci aktive olmuş T hücreleri tarafından taşınmaktadır. Bu yüzden Tregleri CD25 taşıyan diğer hücre tiplerinden ayırmada farklı belirteçlerin varlığına ihtiyaç duyulmuştur. Bunların başında FoxP3 transkripsiyon faktörü gelir. 2003 yılında Hori ve arkadaşları yaptıkları çalışmada naif T hücrelerini FoxP3'ü kodlayan geni taşıyan retrovirüslerle transdükte ettiklerinde, naif T hücrelerinin Treg hücrelerine dönüştüğünü göstermişlerdir ve sitotoksikite deneyleri ile in vivo ve in vitro etkinliklerini bildirmişlerdir¹⁷.

Tregleri diğer hücrelerden ayırmak için kullanılan ek belirteçler GITR, CTLA-4, PD-1, CD40, B7-H1, B7-H4, OX40 ve "Folat Receptor-4" (FR-4) tür¹⁸⁻²². Treglerin etki mekanizması üzerine başlıca iki görüş vardır. Treglerin baskılayıcı fonksiyonlarını göstermek için hücre-hücre teması yaptıkları ya da IL-10 veya transforming growth faktör gibi sitokinleri salgılayarak uzaktaki hücreleri dahi etkileyebildiği düşünülmektedir. PD-1 ve CTLA-4'ün T hücreleri inhibe edici etkisi bilinmektedir.

Bununla birlikte IL-10 ve TGF- β , Th1 tip sitokinlerden IL-2 ve IL-12'nin ifadesini baskılamaktadır. Diğer mekanizmalar ise natural Treglerin indoleamine 2,3 (IDO) veya siklik AMP ile T hücre aktivasyonunu inhibe ettikleri ve T hücre apoptozunu uyarmaları ile ortaya çıkan etkidir²³.

MULTİPL MİYELOM VE REGÜLATÖR T HÜCRELER

Kanserde FoxP3 ifade eden hücreler zayıf anti-tümör efektör yanıt ile ilişkilidir. Bu nedenle tümör immünitesi için risk oluşturur²⁴. Walter ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada Tregler lokal immün çevrede potansiyel belirteç/terapötik hedef ve prognostik etkisi bakımından multipl miyelom hastalarında kemik iliğinde incelenmiştir. Kontrollere oranla multipl miyelom hastalarında FoxP3 ifadesi 6 kat yüksek bulunmuştur²⁴. Bu durum multipl miyelomda Treglerin kemik iliğinde lokal birikimini desteklemektedir.

TGF β 'ya IL-6 veya IL-21 ilavesi Treg gelişim yolağını ortadan kaldırır, yerine Th17 gelişimini uyarır. IL-6, Th17/Treg dönüşümünde kritik role sahiptir. Fakat aynı zamanda IL-6 multipl miyelomda otokrin ve parakrin üretilmekte ve de tümör hücrelerinin progresyonunu ve sağkalımını ilerletmektedir²⁵.

Otolog nakil sonrası tümör antijenlerine bağlı olarak T hücre repertuarı çarpık biçimde gelişir. Anti-tümör immünitenin indüksiyonuna öncülük eder. Fakat tümörlerde immünesupresif mikroçevrenin hematopoietik kök hücre nakli ile değişimi bilinmemektedir. Bir diğer çalışmada fare modellerinde hematopoietik kök hücre nakli sonrası FoxP3 ifade eden CD4⁺ hücrelerin tümörlerde azaldığı, nakil sonrası tümörlerde VEGF-D konsantrasyonu arttığı, VEGF-D uyarımı ile dendritik hücrelerin IL-6 ürettiği ve de Treglerin suprese edildiği gösterilmiştir. Üstelik anti VEGFR-3 antikoru kullanımı dendritik hücrelerden IL-6 üretimini baskılamakta ve de hematopoietik kök hücre nakli sonrası tümörlerde Treg artışına neden olmaktadır²⁶. Otolog kök hücre naklinin oluşturduğu çevre güçlü biçimde Treglerin supresyonu ile anti tümör immüniteyi desteklemektedir.

IL-6'nın FoxP3 metilasyonunu artırdığı ve natural Treglerde FoxP3 transkripsiyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bir diğer çalışmada multipl miyelomda Th1/Th2/Th17/Treg hücrelerinin değişimi ve klinik önemi değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 33

multipl miyelom hastasında kontrollere göre Th1 ve Th17 hücreleri artarken Tregler azalmış, Th2 hücreleri aynı miktarda gözlemlenmiştir. γ IFN, IL-6 ve IL-17A sitokinleri artarken, IL-2, IL-4 değişmemiş, IL-10 ve TGF β azalmıştır²⁷. Bulgular literatürle uyuşmasa da benzer bulgular mevcuttur. Fakat T lenfosit alt gruplarındaki dengesiz dağılımın multipl miyelom patogenezi ve altında yatan mekanizmalara katkıda bulunduğu bir gerçektir.

Bir diğer çalışmada multipl miyelomda Treglerin sayısının ve supresif potansiyellerinin devamlılığının talidomidle ya da otolog nakille hastalar tedavi edildiklerinde arttığı rapor edilmiştir²⁸. Lenalidomid tedavisinde de Treg artışı söz konusudur²⁹. Son on yılda, Tregler neoplazmların geniş bir paneline karşı immün yanıtı kötüleştirdiğinden dolayı büyük ilgi çekmiştir. CD4⁺ Tregler yeni tanı ve relaps multipl miyelomda sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında önemli derecede yüksektir²⁸. Üstelik kısa progresyon zamanı ile Treglerin ilişkili olması multipl miyelomda Treglerin klinik önemini de açığa çıkarmaktadır²⁹⁻³¹.

Ülkemizde de multipl miyelom Treg ilişkisi ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlamıştır. Treglerin multipl miyelomda otolog kök hücre nakli sonrası arttığı gösterilmiş (11 hasta) ve otolog nakil, Treg ve galektin 1 ifadesi arasındaki ilişki 19 hastada sorgulanmıştır^{32,33}.

Multipl miyelom hücrelerinin Treg bağımlı immün kaçışı ve Treglerin tümör bağımlı gelişimi tehlikeli bir döngüyü destekleyebilir ki bu durum hastalık progresyonuna izin vermektedir^{34,35}. Bu doğrultuda Tregler multipl miyelom tedavisi için klinik açıdan ilgi çekmektedir. Treglerin over kanserinde, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, gastrointestinal kanserlerde, meme kanserinde, hodgkin lenfomada ve kronik lenfositik lösemide de arttığı gösterilmiştir⁸.

MULTİPL MİYELOM VE PD-1/PDL1-PDL2 İLİŞKİSİ

PD-1 (CD279, programlanmış ölüm-1), T ve B lenfositler, dendritik hücreler, monositler ve makrofajlar da dahil olmak üzere çeşitli immün hücrelerde ifade edilen CD28 ailesinden bir inhibitör reseptördür³⁶. PD-1'in görece geniş bir ekspresyon şablonu olsa da, en önemli rolü muhtemelen T hücreler üzerindeki koinhibitör reseptör olarak görevidir. Mevcut terapötik yaklaşımlar, T hücre tepkilerini artırmak için bu reseptörün ligandlarıyla etkileşimini bloke etmeye odaklanmaktadır. Hem

PDL1 (B7-H1, CD274) hem de PDL2 (B7-DC, CD273) B7 ailesinin üyesidir ve günümüzde PD-1'in bilinen tek ligandlarıdır³⁷⁻³⁹. Bununla birlikte, etkileri yalnızca PD-1 yoluyla iletilmez çünkü PDL1, B7-1 ile etkileşime girmekte ve PDL2 ise diğer reseptöre bağlanabilmektedir. PDL1, T hücrelerde, B hücrelerde, monositlerde, makrofajlarda ve dendritik hücrelerde görülebilir ve tipik olarak aktivasyon ile düzenlenir. Temel olarak antijen sunan hücreler üzerindeki ifadesi ile sınırlı olan klasik B7 ailesi üyeleri B7-1 ve B7-2'nin aksine, PDL1, kalp, pankreas, plasenta, vasküler endotelium, karaciğer, akciğer ve deri de dahil olmak üzere birçok hematopoetik olmayan dokuda ifade edilir⁴⁰. Bu doku ifadesi periferdeki immün tepkileri düzenlemede önemli bir rol oynar^{41,42}.

Bu normal dokulara ek olarak PDL1, kanserli hücrelerde immün takibi atlatmak için bir mekanizma olarak sıkça yüksek ifade edilir. Büyük ihtimalle, antijen sunan hücreler üzerinde ve tümörler de dahil olmak üzere hematopoetik olmayan dokularda PDL1/L2 ifadesi terapötik açıdan en önemlisidir. Birçok tümör PDL1 ifade etmektedir. Bu molekül kanser karşıtı immün tepkileri baskılayabilmektedir. Normal plazma hücreleri üzerinde saptanmamış olsa dahi, kemik iliğindeki miyelom hücre dizileri ve primer miyelom hücreleri PDL1'i ifade etmektedir. Ligandı PD-1 ise miyelom hastalarındaki T lenfositlerde bulunmaktadır^{43,44}. Her ne kadar anti PD-1 tedavisi şimdiye kadar tek başına etkin olamamışsa da, miyelom hastaları arasında farklılıklar olup olmadığını teyit etmek açısından lökosit alt gruplarında PDL1 ve PDL2 ifadesini karakterize etmek yine de önemlidir. Şayet durum buysa, hastaların yalnızca alt grupları terapiye yanıt verebilir. PD-1 yolağı yardımcı T hücre popülasyonunu regülatör T hücre gelişimi yönünde uyarılmaktadır. PDL1'in hem in vitro hem de in vivo olarak indüklenebilir regülatör T hücrelerinin (iTregler) farklılaştırılmasında önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır⁴⁵. Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab ve Pidilizumab gibi humanize edilmiş anti PDL1 veya PD-1 antikör terapileriyle tedavinin arkasında yatan mantık bu ligasyonu in vivo bloke etmektedir⁴⁶.

SONUÇ

Mevcut literatüre göre miyelom hastalarının anti PD-1/PDL1 tedavisinden fayda sağlayabileceğini

önermekteyiz. Bununla birlikte, tedaviden fayda sağlayabilecek hastaları tanımlamak için plazma hücrelere ek olarak regülatör T hücreler üzerindeki PD-1 ifadesini araştırmak gerekli olabilir. Bu bulgular multipl miyelomda terapötik hedefler ve olası belirteçler hakkında yeni anlayışlar sağlamaktadır. Miyelom hastaları kemik iliğinde PDL1 ifade etmektedir. Ancak bu periferik kanda görülmemektedir ki bu da tümör ortamında mevcut bulunan faktörlerin PDL1 ifadesi açısından önemli olduğunu öne sürmektedir. Dendritik hücreler ve miyelom hücreler üzerinde PDL1 ifadesi, anti-tümör immüniteyi azaltmada eşit oranda önemli olabilir. Anti-tümör aktivitesini azaltmak için tümörde ya da onun mikro ortamındaki PDL1 ifadesinin herhangi bir eşiği olup olmadığı bilinmemektedir. T hücrelerde tümör mikro ortamı içerisindeki PD-1 ifadesi kanser tedavisine yönelik immünoterapinin kullanımında çok önemli bir faktördür. Son zamanlarda multipl miyelomda PDL1 veya PD-1'i hedef alan klinik çalışmalar başlatılmıştır. Şu anda bu molekülleri incelemek için heyecan verici bir zamandır çünkü bu yola odaklanmış yirmi yılı aşkın temel araştırmadan yararlanan hastaların fayda gördüklerini ancak şimdi görmeye başlıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008;111:2962-72.
2. Raja KRM, Kubiczkova L, Rihova L, Piskacek M, Vsianska P, Hezova R et al. Functionally suppressive cd8 t regulatory cells are increased in patients with multiple myeloma: a cause for immune impairment. *PLoS One*. 2012;7:e49446.
3. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20:1467-73.
4. Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clinic Proc*. 1975;50:29-40.
5. Kyle RA, Gertz MA, Witzing TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proc*. 2003;78:21-33.
6. Türk Hematoloji Derneği. *Hematolog. Multipl Miyelom*. 2013;3:32-3.
7. Raja KRM, Kovarova L, Hajek R. Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders. *Br J Haematol*. 2010;149:334-51.
8. Joshua DE, Brown RD, Ho PJ, Gibson J. Regulatory T cells and multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2008;8:283-6.

9. Belkaid Y. Regulatory T cells and infections: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:875-88.
10. Akdis CA, Blaser K. Bypassing IgE and targeting T cells for specific immunotherapy of allergy. *Trends Immunol.* 2001;22:175-8.
11. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wu TB, Blaser K. Role of IL-10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest.* 1998;102:98-106.
12. Lianjun Z, Yong Z. The regulation of FoxP3 Expression in regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol.* 2007;211:590-7.
13. Mantel PY, Ouaked N, Rückert B, Karagiannidis C, Welz R, Blaser K et al. Molecular mechanisms underlying Foxp3 induction in human T cells. *J Immunol.* 2006;176:3593-602.
14. Ziegler SF, Buckner JH. Foxp3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect.* 2009;11:594-8.
15. Başkan EB. T hücre immünesisi. *Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi.* 2013;47(Özel Sayı 1):18-23.
16. Mays LE, Chen YH. Maintaining immunological tolerance with Foxp3. *Cell Res.* 2007;17:904-18.
17. Hori S, Nomura T, Sakauchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;14:299:1057-61.
18. Chess L. The birth of functionally distinct T cell subsets. *J Immunol.* 2006;176:3859-60.
19. Jiang H, Chess L. Regulation T cells-teh renaissance of the suppressor T cells. *Ann Med.* 2007;39:322-34.
20. Taams LS, Vukmanovic-Stejić M, Smith J, Dunne PJ, Fletcher JM, Plunkett FJ et al. Antigen-specific T cell suppression by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2002;32:1621-30.
21. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 1999;162:5317-26.
22. Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD et al. Human CD4⁺CD25⁺ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood.* 2001;98:2736-44.
23. Miyaral M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007;13:108-15.
24. Braga WMT, Silva BR, Carvalho AC, Maekawa YH, Bortoluzzo AB, Rizzatti EG et al. Foxp3 and Ccl4 overexpression in multiple myeloma bone marrow as a sign of accumulation of CD4⁺ T regulatory cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63:1189-97.
25. Braga WMT, Atanackovic D, Colleoni GWB. The Role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:293479.
26. Udagawa T, Narumi K, Suzuki K, Aida K, Miyakawa R, Ikarashi Y et al. Vascular endothelial growth factor-D-mediated blockade of regulatory T cells within tumors is induced by hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol.* 2013;191:3440-52.
27. Feng P, Yan R, Dai X, Xie X, Wen H, Yang S. The alteration and clinical significance of Th1/Th2/Th17/Treg cells in patients with multiple myeloma. *Inflammation.* 2015;38:705-9.
28. Ganeshan P, Gupta R, Hakim M, Kumar L, Bhaskar A, Sharma A. Reconstitution of regulatory T cells after autologous transplantation in multiple myeloma. *Int J Hematol.* 2011;94:578-9.
29. Raja KRM, Hajek R. Contribution of regulatory T cells to immunosuppression and disease progression in multiple myeloma patients. *Oncoimmunology.* 2013;2:e25619.
30. Raja KRM, Rihova L, Zahradova L, Klincova M, Penka M, Hajek R. Increased T regulatory cells are associated with adverse clinical features and predict progression in multiple myeloma. *PLoS One.* 2012;7:e47077.
31. Giannopoulos K, Kaminska W, Hus I, and Dmoszynska A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterization of immune status in multiple myeloma. *Br J Cancer.* 2012;106:546-52.
32. Erçetin AP, Aktaş S, Pişkin Ö, Özcan MA. Multipl miyelomda Galektin-1 ekspresyonunun düzenleyici T hücreler ve otolog kemik iliği transplantasyonu ile ilişkisi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2011;25:137-43.
33. Erçetin AP, Aktaş S, Pişkin Ö, Ateş H, Zadeoğulları ZF, Turgut NH et al. Multipl miyelomda T düzenleyici hücreleri ile otolog çevre kanı kök hücre nakli arasındaki korelasyonun araştırılması. *Türk J Haematol.* 2011;28:107-14.
34. Ates A, Ilhan O, Ozcan M, Dalva K, Ugur N, Beksac M et al. T-cell subsets in multiple myeloma: Relation to clinical phase and stage of disease and prognosis. *Blood.* 1998;92:260B.
35. Özer H, Han T, Henderson ES, Nussbaum A, Sheedy D. Immunoregulatory T cell function in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 1981;67:779-89.
36. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992;11:3887-95.
37. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001;2:261-8.
38. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999;5:1365-9.
39. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule

- with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 2001;193:839-46.
40. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp Med.* 2000;192:1027-34.
41. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med.* 2006;203:883-95.
42. Scanduzzi L, Ghosh K, Hofmeyer KA, Abadi YM, Lázár-Molnár E, Lin EY et al. Tissue-expressed B7-H1 critically controls intestinal inflammation. *Cell Rep.* 2014;6:625-32.
43. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood.* 2007;110:296-304.
44. Ray A, Das DS, Song Y, Richardson P, Munshi NC, Chauhan D et al. Targeting PD1-PDL1 immune check-point in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia.* 2015;29:1441-4.
45. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2009;206:3015-29.
46. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3—potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:45-56.