

Received: 2005.01.21
 Accepted: 2005.03.02
 Published: 2005.04.21

Komórki regulatorowe: powstawanie, mechanizmy i efekty działania oraz możliwe wykorzystanie w transplantologii*

Regulatory cells: their development, mechanisms and effects of action, and their potential use in transplantation

Marta Żylicz¹, Katarzyna Bocian¹, Grażyna Korczak-Kowalska^{1,2}

¹ Zakład Immunologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

² Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Transplantologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

Komórki regulatorowe to bardzo niejednorodna populacja limfocytów T. Uważa się, że mogą powstawać zarówno w grasicy, jak i na obwodzie. Niektórzy badacze przypuszczają, że każda populacja limfocytów T może na obwodzie różnicować się w komórki pełniące funkcje regulatorowe. Komórki regulatorowe stanowią w ostatnich latach obiekt bardzo intensywnych badań – zaobserwowano bowiem, że biorą one udział w utrzymywaniu homeostazy limfocytów T oraz zapobiegają powstawaniu chorób autoimmunizacyjnych, alergii i wszelkiej nadwrażliwości. W czasie ciąży uczestniczą też w wykształcaniu tolerancji na płód. W sztucznie stworzonej przez człowieka sytuacji, jaką jest przeszczep, komórki regulatorowe przyczyniają się do wykształcenia i utrzymywania tolerancji dla przeszczepionej tkanki lub komórek oraz zapobiegają reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi. Jednocześnie jednak komórki te są odpowiedzialne za mniejszą odporność na nowotwory i infekcje. Dotychczas zgromadzone dane dotyczące komórek regulatorowych nie pozwalają na ustalenie jednoznacznej charakterystyki ani sposobów ich identyfikacji. Można to tłumaczyć istnieniem wielu populacji tych komórek, a także różnych mechanizmów ich działania w zależności od modelu badawczego. Sprzeczne wyniki doświadczeń *in vitro* i *in vivo*, a także brak pewności co do przełożenia wyników badań prowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych na efekty u ludzi powodują, że ewentualne zastosowanie komórek regulatorowych w praktyce klinicznej jest na razie kwestią odległą, choć budzącą wielkie nadzieje. Celem niniejszego artykułu jest usystematyzowanie dotychczas zgromadzonej wiedzy na temat komórek regulatorowych i przedstawienie możliwości wykorzystania ich w transplantologii.

Słowa kluczowe:

tolerancja transplantacyjna • komórki regulatorowe • „łączona” supresja • „zaraźliwa” tolerancja • leki immunosupresyjne • reakcja przeszczep przeciwko gospodarzowi

Summary

Regulatory cells comprise a highly heterogeneous T-cell population. It is assumed they are generated both in the thymus and periphery. According to some immunologists, any T-cell population has the potential to differentiate into cells with regulatory properties in the periphery. Following the discovery of their role in maintaining T-cell homeostasis and their ability to prevent autoim-

* Praca finansowana z projektu KBN nr 3 P05B 07425

mune disease, allergy, and other types of hypersensitivity, regulatory cells have been the focus of intense studies over the last decade. During pregnancy, regulatory cells are believed to mediate tolerance to the fetus. In the unnatural event of transplantation, regulatory cells induce and maintain tolerance to the transplanted tissues or cells and prevent graft-versus-host disease. At the same time, however, regulatory cells are responsible for decreased immunity against tumors and infections. The data which have emerged to date concerning regulatory cells have not allowed them to be definitively identified nor their characteristics to be clearly defined. This may be due to the existence of various regulatory cell populations as well as different modes of action depending on the experimental model. Contradictory *in vitro* and *in vivo* results and the lack of certainty as to how the results of animal trials correspond with the human model are why the notion of harnessing regulatory cells as therapeutic agents is still a distant one, although raising great hopes. The aim of the following article is to make sense of the patchwork of available data concerning regulatory cells and review the potential use of these cells in the field of transplantation.

Key words: transplantation tolerance • regulatory cells • linked suppression • infectious tolerance • immunosuppressive drugs • graft-versus-host disease

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7344.pdf

Word count: 6217

Tables: 1

Figures: –

References: 83

Adres autorki: Marta Żylicz, Zakład Immunologii, Wydział Biologii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: marta-23@wp.pl

TOLERANCJA ORGANIZMU

Tolerancja immunologiczna to wyselekcjonowany brak odpowiedzi organizmu na określone antygeny – układ odpornościowy nie rozwija odpowiedzi na dany antygen przy zachowaniu prawidłowej odpowiedzi na inne antygeny. Tolerancja na autoantygeny wykształcana jest w centralnych narządach limfatycznych w procesie dojrzewania limfocytów T i B. Limfocyty rozpoznające własne antygeny prezentowane przez komórki prezentujące antygen (APC) ulegają apoptozie. Na wypadek, gdyby limfocyty takie wydostały się jednak na obwód, istnieją mechanizmy zabezpieczające organizm przed ich atakiem na tkanki organizmu. Mechanizmy te, zwane mechanizmami tolerancji obwodowej, obejmują delecję i anergię klonalną, ignorancję, a także aktywną supresję przez komórki regulatorowe. Te same mechanizmy uczestniczą w indukcji i utrzymaniu tolerancji na obce antygeny, np. antygeny przeszczepu, przy czym zasadniczą rolę odgrywają komórki regulatorowe.

Pojawienie się w organizmie obcych antygenów indukuje aktywację swoistych limfocytów T. Alloantygeny dawcy mogą być rozpoznane przez komórki biorcy na dwa sposoby: bezpośredni i pośredni. Bezpośrednio nienaruszony antygen dawcy prezentowany jest limfocytom T na APC dawcy. Pośrednio antygeny dawcy są przetworzone i prezentowane na komórkach APC biorcy. Ten drugi sposób zdecydowanie przeważa w regulacji odpowiedzi immunologicznej.

Po transplantacji, leukocyty znajdujące się w przeszczepionej tkance migrują poza organ dawcy i dostają się do węzłów chłonnych biorcy. Tak inicjowany jest proces odrzucania przeszczepu. O ile przez podanie leków immunosupresyj-

nych lub indukcję tolerancji dla alloantygenów dawcy przed dokonaniem przeszczepu można zapobiec jego odrzuceniu, o tyle migracja leukocytów na ogół nie zostaje zahamowana. Długotrwałe akceptowane przeszczepy zasiedlane są zwykle przez niewielką liczbę leukocytów dawcy; sama przeszczepiona tkanka może wtedy nie mieć odpowiednio silnego sygnału kostymulującego do zaindukowania odpowiedzi naiwnych limfocytów T (limfocytów, które nie zetknęły się jeszcze z antygenem) bezpośrednio. Limfocyty biorcy reagujące na alloantygeny prezentowane pośrednio mogą natomiast otrzymywać stymulację nieustannie. Dowiedziono, że komórki regulatorowe wymagają takiej ciągłej stymulacji, aby utrzymywać swoją funkcję, zarówno po podaniu antygeny [10], jak i transplantacji narządu [27]. Główną rolę w utrzymaniu tolerancji organizmu na obce antygeny ma więc prezentacja allopeptydów dawcy na APC biorcy.

Biorcy przeszczepów alogenicznych muszą otrzymywać leki hamujące odpowiedź układu immunologicznego biorcy na antygeny dawcy. Większość leków immunosupresyjnych stosowanych w transplantologii w sposób nieswoisty hamuje aktywację limfocytów T, co zwiększa ryzyko infekcji i innych powikłań potransplantacyjnych, a najprawdopodobniej uniemożliwia też powstawanie swoistych względem antygenów przeszczepu komórek regulatorowych. Wyzwaniem dla współczesnej nauki jest zwiększenie swoistości terapii immunosupresyjnej; wielkie nadzieje pokłada się w opracowaniu terapii wykorzystującej występujące w organizmie komórki regulatorowe.

IDENTYFIKACJA KOMÓREK REGULATOROWYCH

Nie określono jeszcze ostatecznie swoistych dla komórek regulatorowych markerów, obecnych zarówno w organi-

Tabela 1. Populacje komórek regulatorowych

Fenotyp	Nazwa	Funkcja	Mechanizm działania
CD4+CD25+	naturalne komórki regulatorowe, Trn	zapewnienie homeostazy, ochrona przed autoimmunizacją i nadwrażliwością	bezpośredni kontakt
CD4+	TH1*	regulacja komórek TH2	IFN- γ
CD4+	TH2*	regulacja komórek TH1	IL-4
CD4+	TH3 (zwane też TR2)	tolerancja pokarmowa i nosowa, ochrona przed autoimmunizacją	TGF- β
CD4+	TR1	ochrona tkanek własnych przed atakiem limfocytów TH	IL-10
CD8+	TR1 lub TR2	prawdopodobnie indukcja tolerancji pokarmowej	IL-10/TGF- β
CD8+CD25+	CD8+CD25+	podobnie jak Trn	bezpośredni kontakt, TGF- β
CD8+CD28-	TS	wyciszenie odpowiedzi immunologicznej (modulacja DC)	interakcja z ligandem na DC
CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ +	DN	zapobieganie odrzucaniu przeszczepu (hamowanie limfocytów CD8+)	Fas-FasL
TCR $\alpha\beta$ +NK1.1+	NKT	tolerancja obwodowa; działanie cytotoksyczne (przeciwnowotworowe)	IL-4, IFN- γ , TGF- β
TCR $\gamma\delta$ +	TCR $\gamma\delta$	supresja odpowiedzi przeciwnowotworowej i przeciwzakaźnej	IL-10, TGF- β

* Niektórzy badacze nie zaliczają tych dwóch populacji do komórek regulatorowych

zmach kontrolnych, jak i poddanych działaniom eksperymentalnym. Takim działaniem może być stymulacja przez alloantypen lub terapia przeciwciałami monoklonalnymi czy lekami immunosupresyjnymi.

Najszerzej opisywaną w literaturze populacją komórek regulatorowych są limfocyty T o fenotypie CD4⁺CD25⁺, nazywane Trn. W odróżnieniu od aktywowanych limfocytów CD4⁺, wykazujących jedynie przejściową ekspresję markera CD25, czyli podjednostki α receptora interleukiny 2 (IL-2), Trn wykazują stałą ekspresję na wysokim poziomie. Są one wytwarzane w grasicy w sposób ciągły: w zachodzącym tam procesie dojrzewania i selekcji limfocyty rozpoznające autoantygeny mogą ulec apoptozie lub różnicować się w komórki Trn. Komórki o tym samym fenotypie występujące na obwodzie są podobne funkcjonalnie, jednak sposoby powstawania obwodowych antygenowo swoistych limfocytów CD4⁺CD25⁺ i innych komórek regulatorowych nie zostały jeszcze do końca zbadane (w przypadku izolowanych z ludzkiej krwi obwodowej komórek o fenotypie CD4⁺CD25⁺ wykazujących cechy mysich komórek Trn nie ma pewności, czy powstały one w grasicy czy na obwodzie, jednak dla uproszczenia będą tu nazywane Trn). Populacjami, których obecność stwierdzono u zdrowych myszy i ludzi, niepoddawanych działaniom żadnych czynników, są Trn (stanowią one 5–10% limfocytów CD4⁺ obecnych we krwi obwodowej u myszy, u ludzi – nie więcej niż 2%; występują też w narządach limfatycznych), CD8⁺CD25⁺ (stanowiące poniżej 1% populacji komórek CD8⁺ u myszy), naturalne limfocyty T cytotoksyczne (NKT) oraz komórki T_R1. Komórki reprezentujące wszystkie te populacje można też wytworzyć przez podanie antygeny. Dotychczas zbadane fenotypy komórek

regulatorowych, występujących naturalnie lub możliwych do zaindukowania przez podanie myszom antygeny, przedstawia tabela 1.

CHARAKTERYSTYKA NATURALNYCH KOMÓREK REGULATOROWYCH (TRN)

Nabycie przez Trn zdolności supresorowych wymaga aktywacji antygenem [77]. Jeśli już zostaną zaktywowane, komórki te działają w sposób całkowicie antygenowo nieswoisty [70], co znacznie wzmacnia wywoływany przez nie efekt supresorowy. Trn są anergiczne i niezdolne do proliferacji *in vitro* [64]. Dodanie do hodowli IL-2 powoduje jednak częściowe przełamanie stanu anergii i proliferację [53,67]. Dojrzałe, spoczynkowe limfocyty Trn myszy i ludzi wykazują fenotyp komórek już zaktywowanych antygenem: wysoką ekspresję cząsteczek, takich jak CD44 i CD54 (cząsteczka adhezyjna ICAM), a przede wszystkim CD25. Wykazują wysoką i stałą ekspresję CD25, co odróżnia je od zaktywowanych komórek z populacji CD4⁺ i CD8⁺ (również T_R1 i T_R2), wykazujących niższą i przejściową ekspresję tego markera. Ponadto, w odróżnieniu od aktywowanych limfocytów CD4⁺ wykazujących fenotyp CD62L^{low} (CD62L to selektyna L), spoczynkowe Trn określa się jako CD62L^{high} [18]. Na to, że komórki te zetknęły się już z antygenem, wskazuje też wykazywany przez nie fenotyp komórek pamięci: niemal wszystkie komórki Trn zawierają się w populacji CD45RB^{low} u myszy [4] i w populacji CD45RB⁺CD45RO⁺ u ludzi [63].

U osobników niewytwarzających IL-2 (myszy IL-2 KO – mających knock out genu IL-2) Trn w ogóle nie występują – cytokina ta jest niezbędna w procesie ich powstawania [53].

Wykazano też jej udział w przeżywaniu i ekspansji komórek na obwodzie [48]. Blokada receptora IL-2 całkowicie neutralizuje zdolności supresorowe Trn *in vitro* [17]. U myszy z niefunkcjonalnymi genami kodującymi cząsteczki kostymulujące (CD28 na limfocytach T, B7 i CD40 na APC) liczba limfocytów Trn jest znacznie obniżona, co można tłumaczyć spadkiem wytwarzania tych komórek w grasicy lub niezdolnością do przeżycia na obwodzie. Występujące w niewielkich ilościach komórki Trn wykazują jednak wszelkie funkcje regulatorowe *in vivo* i *in vitro* – cząsteczki kostymulujące nie są więc konieczne do pełnienia przez nie funkcji efektorowych. Trn charakteryzują się ekspresją czynnika transkrypcyjnego zwanego Foxp3. Wiadomo, że aktywuje on transkrypcję białka skurfiny, jednak nieznanne są inne aktywowane geny ani ich udział w pełnieniu funkcji supresorowych. U myszy Foxp3^{-/-} wykształcają się patologiczne objawy, typowe dla osobników pozbawionych komórek Trn. Myszy transgeniczne o zwiększonej ekspresji Foxp3 mają więcej komórek Trn niż normalne myszy [39]. Wyniki badań nie pozostawiają wątpliwości, że Foxp3 pełni główną rolę w powstawaniu i pełnieniu funkcji przez te komórki.

Przekazywanie sygnału przez CD28 hamuje zdolności supresorowe Trn [64] – aktywność komórek promowana jest przy słabym sygnale aktywacyjnym. Komórki te wykazują konstytutywną ekspresję cząsteczki CTLA-4 (CD152, antygen 4 związany z cytotoksycznymi limfocytami T), która należy do tej samej rodziny co CD28, jednak działa do niej antagonistycznie i jest odpowiedzialna za wspomaganie supresyjnej aktywności komórek Trn. Obserwuje się też wysoką i konstytutywną ekspresję cząsteczki GITR (indukowanego przez glukokortykoidy receptora TNF – czynnika martwicy nowotworu); przekazywanie sygnału za pośrednictwem GITR osłabia właściwości supresorowe. Trn nie wytwarzają IL-2, nie stwierdzono u nich obecności mRNA dla tej cytokiny. Wykazują natomiast ekspresję mRNA dla IL-10, TGF-β oraz IL-4, jednak cytokin tych nie wydzielają *in vitro* [52], choć w wielu pracach sugeruje się wydzielanie IL-10 *in vivo* i udział tej cytokiny w pełnieniu przez komórki regulatorowe funkcji efektorowych [28]; rola TGF-β pozostaje sporna.

Gromadzenie się limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ na obwodzie u osobników IL-2 KO oraz występowanie u nich rozmaitych chorób autoimmunizacyjnych stanowią dowód powszechnie uznawanej tezy, że Trn sprawują pieczę nad homeostazą limfocytów T i chronią organizm przed wystąpieniem chorób autoimmunizacyjnych. Jest wiele innych dowodów, np. transfer do tymektomizowanych myszy zawieszonych tymocytów zdrowych osobników, zubożonej o populację komórek Trn, wywołuje takie same objawy chorobowe. Wystąpieniu tych objawów można zapobiec dokonując w porę transferu komórek Trn, lub przynajmniej je złagodzić, jeśli Trn podane zostaną w dłuższym odstępie czasu po podaniu tymocytów [61].

Tak samo, jak limfocyty Trn mogą hamować odpowiedź na autoantygen, mogą też hamować odpowiedź na patogeny (usunięcie populacji Trn prowadzi też do poważnych zaburzeń w odpowiedzi na antygeny bakteryjne). Zbadano, że komórki te wykazują ekspresję pewnych receptorów Toll-podobnych, obecnych też na APC, uczestniczących w rozpoznawaniu wzorców molekularnych związanych z patogenami [60]. Komórki Trn wymagają jednak znacznie

większych stężeń antygenów bakteryjnych, by pobudzona została ich aktywność supresorowa, niż APC, aby dojrzeć i móc aktywować komórki efektorowe. Drugim mechanizmem zabezpieczającym przed supresją odpowiedzi immunologicznej przez komórki regulatorowe w sytuacji, kiedy odpowiedź taka jest potrzebna, np. w czasie infekcji bakteryjnej, jest brak wrażliwości silnie zaktywowanych komórek efektorowych na regulację przez komórki Trn [8]. Ponadto, zaktywowane APC wytwarzają cytokiny (np. IL-6), które hamują aktywność Trn. Wreszcie same komórki Trn są odpowiedzialne za zwrotne hamowanie własnej aktywności, ponieważ hamują wytwarzanie IL-2 przez komórki docelowe, a cytokina ta jest niezbędna do wykonywania przez komórki regulatorowe funkcji supresorowych. Dlatego główna rola komórek Trn w modulowaniu odpowiedzi organizmu na infekcję polega na zapobieganiu lokalnej lub ogólnoustrojowej patologii, takiej jak szok septyczny prowadzący do niszczenia tkanek organizmu.

SWOISTE MARKERY KOMÓREK REGULATOROWYCH

Lista kandydatów swoistych dla komórek regulatorowych markerów stale się powiększa. Do najczęściej wymienianych należą: CD45RB, CTLA-4, GITR oraz CD122 (łańcuch β receptora IL-2). Obecność tych cząsteczek obserwuje się w komórkach Trn myszy i ludzi. Żaden z dotychczas analizowanych markerów nie spełnia jednak kryterium wyłączości i stabilności. Charakterystycznym dla komórek regulatorowych wydaje się natomiast czynnik transkrypcyjny Foxp3, znaleziony po raz pierwszy w komórkach Trn.

U myszy, większość naiwnych limfocytów CD4⁺ wykazuje duże stężenie CD45RB, natomiast limfocyty, które zetknęły się już z antygenem – małe. Aktywność regulatorową obserwuje się w populacji CD4⁺CD45RB^{low}. Zarówno naturalnie występujące komórki Trn i CD8⁺CD25⁺, jak i komórki CD4⁺CD25⁺ występujące u ludzi i myszy doświadczalnych, wykazują konstytutywną ekspresję CTLA-4. Jego ekspresja wydaje się wspomagać regulatorową działalność komórek, jednak nie jest dla nich swoista. Wysoką ekspresję GITR obserwuje się u limfocytów Trn i CD8⁺CD25⁺, a także u limfocytów T_H3, T_R1 i T_R2 po kontakcie z antygenem; przekazywanie sygnału przez GITR może znosić supresyjne działanie komórek regulatorowych. Ekspresję CD122 wykazują ludzkie komórki Trn, natomiast nie stwierdzono związku jego ekspresji z regulatorową aktywnością u myszy. W przeciwieństwie do CD25, CTLA-4 i GITR, ekspresji Foxp3 nie można indukować przez aktywację naiwnych limfocytów T. Ten czynnik transkrypcyjny występuje zarówno u ludzi jak i myszy, w limfocytach CD25⁺ (z populacji CD4⁺ i CD8⁺) występujących w grasicy i na obwodzie, również tych wytworzonych w procesie „zaraźliwej tolerancji” [82]. Nie stwierdzono jego obecności w innych populacjach komórek regulatorowych. Warto jednak zaznaczyć, że wprowadzenie genu Foxp3 do naiwnych limfocytów T zmienia je pod względem fenotypu i funkcjonalnie w komórki regulatorowe [30].

W praktyce laboratoryjnej, w celu wyodrębnienia populacji Trn badacze wciąż opierają się na wysortowaniu komórek o fenotypie CD4⁺CD25⁺. Komórki T_H3, T_R1 i T_R2 wyodrębniane są z populacji CD4⁺ lub CD8⁺ przede wszystkim na podstawie wydzielanych cytokin supresorowych. W przypadku pozostałych populacji komórek regulatorowych, wy-

mienionych w tabeli 1 (T_S , DN, NKT i $TCR\gamma\delta$), identyfikacja odbywa się na podstawie charakterystycznego, trwale wyrażanego układu cząsteczek powierzchniowych – patrz tabela 1 (dla NKT nie znaleziono jednakże markera odróżniającego komórki wykazujące aktywność cytotoksyczną od wykazujących aktywność regulatorową).

EFEKTY DZIAŁANIA KOMÓREK REGULATORYWYCH

Komórki regulatorowe mogą oddziaływać na inne limfocyty T bezpośrednio lub pośrednio, wywierając wpływ na APC. Do modulacji APC w wyniku bezpośredniego kontaktu zdolne są limfocyty Trn [11] i T_S . W przypadku tych ostatnich efekt supresorowy wywołany jest na skutek oddziaływania niezidentyfikowanego liganda na komórce T_S z hamującymi receptorami ILT-3 i ILT-4 znajdującymi się na jednym typie APC – komórkach dendrytycznych (DC) [12]. Inne komórki regulatorowe, takie jak T_R1 i T_H3 , wywierają wpływ na APC przez wydzielanie cytokin supresorowych: IL-10 i TGF- β (transformujący czynnik wzrostu β). W wyniku każdego z tych oddziaływań między komórką regulatorową a APC następuje spadek ekspresji cząsteczek kostymulujących – CD40 oraz CD80/CD86, czyli B7 – na DC lub limfocytach B oraz zmniejszenie ekspresji cząsteczek MHC na tych APC. Tak zmodyfikowane APC nie przesyłają sygnału kostymulującego, który mógłby w pełni zaktywować efektorowe limfocyty T. Indukuje to wejście limfocytów w stan anergii i może prowadzić do powstania limfocytów regulatorowych, np. T_R1 i T_H3 . Stanowi to istotę samonapędzającego się mechanizmu, w którym tolerogenne DC stymulują naiwne limfocyty T do zróżnicowania w komórki regulatorowe, a komórki regulatorowe stymulują różnicowanie prekursorów DC w tolerogenne komórki dendrytyczne.

W wyniku bezpośredniego oddziaływania na limfocyty $CD4^+$, komórki regulatorowe (Trn , T_R1 , T_R2) hamują syntezę IL-2 i proliferację limfocytów, natomiast w przypadku limfocytów $CD8^+$ komórki regulatorowe (Trn , T_R1 , T_R2 , $TCR\gamma\delta$) najprawdopodobniej hamują ich funkcje efektorowe przy zachowaniu zdolności do proliferacji [45,48]. Komórki $TCR\gamma\delta$ mogą też wywierać efekt supresorowy wobec komórek NK. Wykazano również hamowanie przez komórki Trn proliferacji i wytwarzania cytokin przez komórki NKT, co uniemożliwia tym ostatnim pełnienie funkcji cytotoksycznych względem pewnych linii komórek nowotworowych [7]. Supresorowa działalność jednej populacji komórek regulatorowych – komórek DN, podwójnie negatywnych – polega na bezpośrednim zabijaniu docelowych komórek $CD8^+$. Wreszcie komórki Trn i przypominające je komórki $CD4^+CD25^+$ generowane *in vitro* mogą powodować konwersję efektorowych limfocytów T w fenotyp regulatorowy (infectious tolerance – „zaraźliwa” tolerancja).

Zaktywowane komórki regulatorowe mają zdolność hamowania aktywacji i/lub proliferacji limfocytów odpowiadających na inne antygeny prezentowane przez tę samą APC. Supresja jest wtedy antygenowo nieswoista. Dzięki temu zjawisku (linked suppression – „łączona” supresja) i procesowi „zaraźliwej” tolerancji komórki regulatorowe mogą stworzyć w obrębie przeszczepionej tkanki immunologicznie uprzywilejowane środowisko, w którym nie jest rozwijana odpowiedź immunologiczna przeciwko obcym dla organizmu antygenom dawcy.

MECHANIZMY DZIAŁANIA KOMÓREK REGULATORYWYCH

Wyniki badań mających na celu określenie mechanizmów działania komórek regulatorowych, a zwłaszcza roli cytokin w pełnieniu przez nie funkcji efektorowych, pełne są sprzeczności. Do niedawna panowało przekonanie (poparte wynikami badań *in vitro*), że naturalnie występujące komórki regulatorowe działają w sposób niezależny od cytokin, a te wygenerowane na obwodzie – poprzez wydzielane cytokiny. Obecnie jednak proponuje się, że *in vivo*, w pewnych okolicznościach, sam kontakt komórki Trn z komórką docelową nie wystarczy – występowanie silnych sygnałów aktywujących komórki prezentujące antygen powoduje konieczność udziału IL-10 czy TGF- β w regulacji odpowiedzi immunologicznej [17]. Wyniki badań *in vitro* tłumaczy się tym, że supresja przez bezpośredni kontakt z komórką docelową może być dominującą formą supresji, pozwalającą na ominięcie mechanizmów zależnych od cytokin. Inne wyjaśnienia niespójnych wyników dotyczących zaangażowania cytokin w wykształcaniu tolerancji na obce antygeny można upatrywać w mechanizmie „zaraźliwej” tolerancji. W wyniku bezpośredniego kontaktu z komórką docelową komórki Trn prowadzą do powstania komórek regulatorowych zdolnych do supresji w sposób niezależny od kontaktu, a zależny od cytokin: „zarażone” komórki $CD4^+CD25^-$ stają się przypominającymi Trn komórkami $CD4^+CD25^+$, również zdolnymi do generowania kolejnych populacji komórek $CD4^+CD25^+$, jednakże za pośrednictwem TGF- β i IL-10 [82].

Większość badaczy jest zgodna co do tego, że aktywność komórek regulatorowych indukowanych na obwodzie, np. T_R1 i T_R2 , jest ściśle związana z wydzielaniem przez nie cytokin. Bezpośredni kontakt z komórką docelową wydaje się konieczny tylko w niektórych przypadkach. Wyjątek stanowią przypominające Trn indukowane komórki $CD4^+CD25^+$, które mogą wpływać na inne limfocyty T przez sam kontakt komórka-komórka [77].

ROLA CYTOKIN

IL-10 jest cytokiną supresorową, wywierającą hamujący wpływ na różnych poziomach odpowiedzi immunologicznej. Powoduje ona hamowanie wytwarzania cytokin przez komórki T_H1 i aktywowane makrofagi oraz obniżenie ekspresji cząsteczek MHC klasy II, ICAM-1 i B7. IL-10 wydzielana przez niektóre komórki regulatorowe hamuje funkcje efektorowe limfocytów $CD4^+$ i $CD8^+$ zaangażowanych w odrzucanie przeszczepu. IL-10 hamuje też regulatorowe funkcje komórek DN. Być może hamujący wpływ tej cytokiny na populację komórek regulatorowych zaangażowanych w promowanie tolerancji organizmu tłumaczy sprzeczne wyniki eksperymentów z udziałem IL-10 (w niektórych modelach transplantacji egzogenna IL-10 przedłużała czas przeżycia przeszczepów serca u myszy [57], w innych – wręcz przyspieszała odrzucanie przeszczepu [56]).

Zdecydowana większość doświadczeń *in vivo* potwierdza udział IL-10 w rozwijaniu tolerancji transplantacyjnej przez komórki regulatorowe. U myszy niezdolnych do wytwarzania IL-10 (myszy IL-10 KO [55]) lub jej wiązania (w wyniku podawania przeciwciał przeciw receptorowi IL-10 [40]) obserwuje się ostre odrzucanie przeszczepu, wynikające z niezdolności komórek Trn (lub $CD4^+CD45RB^{low}$ w dru-

gim doświadczeniu) do pełnienia funkcji efektorowych. W przypadku ludzkich komórek T_R1 również wykazano wydzielanie IL-10 jako cytokiny efektorowej *in vitro* [35]. Tylko nieliczne badania podważają rolę IL-10 w tolerancji transplantacyjnej [69].

Rola TGF- β budzi więcej kontrowersji. Większość wyników badań *in vitro* wskazuje, że TGF- β nie jest potrzebny do pełnienia funkcji efektorowych przez komórki Trn [69]; wykazano też prawidłowe pełnienie funkcji efektorowych komórek Trn myszy pozbawionych TGF- β [54]. W innych badaniach wykryto jednak obecność TGF- β związanego na powierzchni komórek Trn po ich aktywacji, a cytokina ta była niezbędna do podtrzymania funkcji efektorowej komórek [51]. Niedawno wykazano rolę TGF- β w pełnieniu przez Trn funkcji efektorowych *in vivo* [50].

Niektórzy wskazują na powiązanie IL-10 z TGF- β . IL-10 wzmacnia bowiem ekspresję receptora TGF- β na aktywowanych i spoczynkowych limfocytach T. Z kolei TGF- β może indukować wytwarzanie IL-10 przez APC [46]. TGF- β również wykazuje silne działanie supresorowe, hamując aktywację makrofagów oraz proliferację limfocytów T i B. TGF- β hamuje wytwarzanie IL-2 i ekspresję receptorów dla niej, jednak przy dostatecznie dużym stężeniu IL-2 w otoczeniu działa na limfocyty kostymulująco, prowadząc do podwyższenia ekspresji CD25, CTLA-4, CD154, GITR i CD122, a to prowadzi do powstawania nowych komórek CD4⁺CD25⁺ o właściwościach regulatorowych [82].

Wyniki niektórych badań nad rolą IL-4 sugerują, że cytokina ta może być istotna przy indukcji, ale nie utrzymywaniu, tolerancji dla tkanek przeszczepu przez komórki regulatorowe [28]. Większość badaczy wyklucza jednak jakikolwiek udział IL-4 [69].

UDZIAŁ CZĄSTECZEK POWIERZCHNIOWYCH

Nie udało się jeszcze ustalić mechanizmu, dzięki któremu pewne komórki regulatorowe wywierają swoje funkcje efektorowe przez sam kontakt z komórką docelową. Wykazano taką zdolność u limfocytów Trn, przypominających je komórek CD4⁺CD25⁺ generowanych *in vitro* oraz komórek CD8⁺CD25⁺.

Prawidłowe funkcjonowanie *in vitro* komórek Trn myszy transgenicznych pozbawionych genu CD28 lub CD40 wskazuje na brak udziału cząsteczek kostymulujących w wywieraniu wpływu na komórki docelowe [69]. Związanie cząsteczki CD28 przez podanie odpowiednich przeciwciał, połączone ze stymulacją przez TCR, prowadzi wręcz do przełamania stanu anergii i utraty zdolności supresorowych komórek Trn u myszy [64,69]. Symulacja przekazywania sygnału przez CD28 przez podanie przeciwciał anty-CD28 nie redukuje supresji wywołanej przez ludzkie komórki Trn [34].

Komórki Trn wykazują konstytutywną ekspresję cząsteczki CTLA-4, która negatywnie reguluje aktywację limfocytów T. W większości opisywanych doświadczeń dotyczących ludzkiej populacji Trn nie stwierdza się udziału cząsteczki CTLA-4 w pełnieniu przez nie funkcji efektorowych *in vitro*, choć jej ekspresja (podobnie jak w przypadku komórek mysich) wzrasta po aktywacji [35]. Podanie

myszom przeciwciał blokujących CTLA-4 hamuje działanie komórek Trn [40], a zdolności supresorowe *in vivo* tej populacji komórek wyizolowanych od myszy niewytwarzających CTLA-4 są słabe [65]. Wykazano rolę CTLA-4 u myszy z trwale akceptowanymi przeszczepami wysp trzustkowych [62].

Nie jest pewne, w jaki sposób cząsteczka CTLA-4 może być związana z funkcjami efektorowymi komórek regulatorowych. Być może preferencyjnie wiąże się z cząsteczkami CD80 i CD86, nie dopuszczając do przekazywania sygnału przez CD28 i tym samym nie dopuszczając do hamowania funkcji supresorowych komórek regulatorowych. Innym wytłumaczeniem może być indukcja wytwarzania TGF- β przez komórki CD4⁺ w wyniku wiązania CTLA-4 [21]. Być może mechanizmy działania CTLA-4 są więc wspólne z mechanizmami działania IL-10.

Badania ekspresji genów u myszy dowiodły, że przekazywanie sygnału przez GITR odgrywa rolę w hamowaniu aktywności supresorowej komórek Trn [49]. Stwierdzono ekspresję liganda tego receptora na różnych typach APC (DC, makrofagach i limfocytach B) [71]. Być może w obecności sygnałów zapalnych na DC zwiększa się ekspresja liganda GITR i komórki regulatorowe są inaktywowane. Nie stwierdzono udziału GITR w hamowaniu supresji w przypadku ludzkich komórek Trn [44].

Molekularne podstawy oddziaływania limfocytów DN na komórki docelowe (aktywowane komórki CD8⁺) zostały dość dokładnie poznane. Funkcja regulatorowa komórek DN opiera się na przekazywaniu sygnału przez TCR i oddziaływaniu Fas-FasL. W procesie zabijania komórek docelowych główną rolę odgrywa białko powierzchniowe Ly-6A, obecne na DN [81].

POWSTAWANIE KOMÓREK REGULATOROWYCH W GRASICY

Komórki Trn powstają w grasicy w trzecim dniu życia myszy (ustalono to na bazie eksperymentów, w których wykonywano tymektomię na myszach) [6]. Delecja tej populacji prowadziła do niekontrolowanej ekspansji komórek CD4⁺CD25⁻ rozpoznających antygeny własne i rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Do powstania komórek Trn niezbędna jest ekspresja endogennie rearanżowanych łańcuchów TCR α lub TCR β – u myszy pozbawionych genu RAG-2 komórki Trn nie powstają [32]. W procesie powstawania komórek Trn w grasicy nie uczestniczą DC [37]. Trn, podobnie jak inne limfocyty, oddziałują z prezentowanymi w grasicy kompleksami peptydów własnych połączonych z cząsteczkami MHC klasy II. Łączą się z kompleksami z powinowactwem na tyle dużym, by promowany był fenotyp regulatorowy, a zbyt słabym, by nastąpiła delecja [32]. Według niektórych badaczy duże powinowactwo do antygeny indukuje wzrost ekspresji Foxp3 – czynnika odpowiedzialnego za fenotyp regulatorowy komórek, które pozytywnie przeszły taką selekcję [19]. Wykazano, że selekcji komórek regulatorowych nie można tłumaczyć zdolnością do ominięcia procesu delecji [58].

Wyniki doświadczeń pokazują, że limfocyty Trn nie stanowią odrębnej linii komórkowej tylko przechodzą selekcję jak wszystkie komórki CD4⁺. Różnią się jednak od innych limfocytów CD4⁺ swoistością względem antygeny. O ile

wśród zwykłych komórek o fenotypie CD4⁺ większość stanowią limfocyty rozpoznające obce antygeny, o tyle Trn rozpoznają przede wszystkim antygeny własne [58].

Na razie nie wiadomo, jakie antygeny własne mogą prowadzić do generowania komórek Trn – czy jest to określony zestaw reprezentatywnych antygenów organizmu czy może to być każdy autoantigen. Na podstawie badań z użyciem transgenicznych myszy stwierdzono, że za generowanie limfocytów Trn odpowiedzialne są komórki endotelialne części rdzeniowej grasicy, na których zachodzi ekspresja swoistych narządowo antygenów własnych [36]. Jednak ekspresja cząsteczek MHC klasy II przez komórki części korowej okazała się wystarczająca by wyselekcjonować funkcjonalne komórki Trn [9]. Selekcja przez komórki epitelialne prawdopodobnie powoduje, że Trn rozpoznają przede wszystkim prezentowane na tych komórkach antygeny własne, co może tłumaczyć występowanie u osobników pozbawionych limfocytów Trn narządowo swoistych, ale nie uogólnionych, chorób autoimmunizacyjnych.

POWSTAWANIE KOMÓREK REGULATOROWYCH NA OBWODZIE

Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające powstawanie na obwodzie komórek regulatorowych, odpowiedzialnych za utrzymanie stanu tolerancji organizmu. Niektórzy badacze sądzą, że są to krążące w organizmie limfocyty, które mogą krzyżowo reagować z alloantygenem. Następuje ekspansja klonalna i komórki te wykazują aktywność regulatorową w sposób swoisty względem antygeny dawcy. Według drugiego schematu istnieją dwa typy komórek regulatorowych. Jednymi z nich są komórki Trn. Pozostałe nie tworzą odrębnej linii komórkowej, tylko mogą być indukowane na obwodzie w określonych warunkach prezentacji antygeny i mogą działać synergistycznie z komórkami Trn.

Dowodu istnienia komórek regulatorowych powstałych na obwodzie dostarczyły badania dotyczące ich powstawania w grasicy [6]. Po tymektomii w trzecim dniu po urodzeniu, komórki regulatorowe nie występowały na obwodzie przez pierwszy tydzień, jednak stopniowo pojawiały się w trzecim miesiącu życia i stanowiły do 20% komórek CD4⁺ występujących w śledzionie. Komórki te musiały powstać z limfocytów CD4⁺CD25⁻, które wydostały się na obwód przed tymektomią. Charakteryzowały się małą wrażliwością na stymulację TCR i mniejszymi zdolnościami supresorowymi w porównaniu z Trn.

Bardzo istotną rolę w generowaniu komórek regulatorowych na obwodzie odgrywają komórki dendrytyczne (DC), nazywane popularnie tolerogennymi lub regulatorowymi. Docierające do DC sygnały aktywacyjne decydują o ich ostatecznym fenotypie. Wydaje się, że w zależności od rodzaju komórki dendrytycznej oraz specyfiki otoczenia, w jakim doszło do prezentacji antygeny, generowane są komórki efektorowe lub różne populacje komórek regulatorowych [26].

DC przechodzą w czasie swojego istnienia kolejne stadia dojrzewania. W ostatnich latach opisano różne subpopulacje komórek dendrytycznych, charakteryzujących się nie-dojrzałym fenotypem, zdolnych do hamowania odpowiedzi immunologicznej. Wymienić należy limfoidalne komórki dendrytyczne CD8α⁺, promujące różnicowanie komórek

T_H2 [47]; DC obecne w płucach, związane z wykształcaniem tolerancji na antygeny podane drogami oddechowymi [2]; DC w kępkach Peyera, związane z tolerancją pokarmową oraz indukcją wydzielających IL-10 limfocytów T_H2 [33]; DC obecne w wątrobie, którym przypisuje się odpowiedzialność za generowanie komórek typu T_R1 oraz małą immunogenność przeszczepów wątroby [68]; DC mieloidalne [59] i wreszcie DC modulowane przez IL-10.

Leki immunosupresyjne, takie jak 1,25-dihydroksywitamina D3 (aktywna postać witaminy) [24], deoksypregualina i glukokortykoidy [1] działają prawdopodobnie na tej samej zasadzie, co egzogenne podawana IL-10: nie dopuszczają do aktywacji DC i promują różnicowanie w komórki regulatorowe.

Same komórki regulatorowe biorcy mogą indukować powstawanie nowych populacji komórek wykazujących właściwości regulatorowe w procesie „zaraźliwej” tolerancji.

Niedawno wykazano udział komórek regulatorowych w wykształcaniu tolerancji na płód [3]. Podejrzewa się, że sama ciąża prowadzi do ekspansji komórek Trn, być może w wyniku zmian hormonalnych. Stwierdzono też istnienie w czasie ciąży wyspecjalizowanych, tolerogennych komórek dendrytycznych wytwarzających TGF-β i/lub IL-10 w drogach rodnych [22].

BADANIA NAD TOLERANCJĄ TRANSPLANTACYJNA

Powtarzający się kontakt z antygenem jest prawdopodobnie czynnikiem wystarczającym do generowania komórek regulatorowych – ciągła obecność antygenów dawcy obecnych w przeszczepionym organie powinna więc promować ich powstawanie. Istnieją przekonujące dowody na to, że sam przeszczep jest elementem najważniejszym w utrzymaniu tolerancji *in vivo*. Mechanizm ten okazuje się jednak niewystarczający (być może ze względu na indukcję silnych sygnałów zapalnych przez przeszczepioną tkankę) i w praktyce medycznej konieczne jest podawanie leków immunosupresyjnych, najczęściej trzech leków o różnych mechanizmach działania.

Większość badań *in vivo* przeprowadza się na myszach i szczurach – nie ma pewności, czy przeprowadzenie takich samych procedur przyniesie u ludzi jednakowe efekty (niektóre markery selekcyjne istotne przy identyfikacji ludzkich komórek regulatorowych, np. CD122, nie są związane z funkcjami regulatorowymi u myszy, zaś typowa dla mysich komórek Trn silna ekspresja CD62L nie może być wykorzystana do izolacji Trn u ludzi, ponadto ta populacja komórek u ludzi jest mniej liczna). Dane dotyczące przeszczepów u myszy często okazują się fałszywie obiecujące w terapii u ludzi. Przykładowo, sama transfuzja krwi dawcy czy terapia pojedynczym lekiem immunosupresyjnym – rapamycyną – okazywały się wystarczające do indukcji trwałej akceptacji przeszczepu alogenicznego przez niektóre szczepy myszy.

Pewne wątpliwości mogą też budzić wyniki doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach z poważnie uszkodzonym układem odpornościowym, takich jak zwierzęta napromieniowane lub myszy SCID (myszy z ciężkim złożonym

niedoborem odporności). Zaletą takich doświadczeń jest możliwość precyzyjnej kontroli wprowadzonych do badanego układu komórek, których udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej jest w ten sposób określany. Jednak obserwowane u takich zwierząt mechanizmy regulatorowe, w których uczestniczą wprowadzane komórki regulatorowe, mogą wynikać nie tyle z fizjologicznych funkcji tych komórek co z mechanizmów homeostatycznych i konkurencji o miejsce w nowym gospodarzu.

W badaniach poświęconych najczęstszym wśród ludzi przeszczepom nerek zwykle wykorzystuje się małpy, natomiast w doświadczeniach na myszach i szczurach najczęściej wykonuje się przeszczepy skóry, serca, wysp trzustkowych, a także szpiku kostnego. Podstawową trudnością występującą przy przeszczepie szpiku kostnego lub transplantacji komórek macierzystych szpiku jest reakcja przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD). Jest to odpowiedź immunologiczna podawanych limfocytów T przeciwko organizmowi biorcy. Leukocyty dawcy napływają do różnych organów biorcy, takich jak jelita, wątroba czy skóra. Aktywacja i ekspansja komórek dawcy prowadzi do sekrecji prozapalnych cytokin i napływu dodatkowych komórek efektorowych uczestniczących w stanach zapalnych, a to prowadzi do dalszego uszkodzenia tkanek.

Najbardziej efektywną metodą uniknięcia GVHD jest usunięcie limfocytów T z przeszczepu, jednak jest to też związane z częstszym odrzucaniem przeszczepu oraz większym ryzykiem oportunistycznych infekcji, nawrotu nowotworów oraz wtórnych chorób limfoproliferacyjnych. Dlatego też obecnie kładzie się nacisk na indukcję alloantygenu swoistej tolerancji wśród limfocytów T dawcy przed dokonaniem przeszczepu. Ogromna ilość badań nad działaniem komórek regulatorowych poświęcona jest właśnie problemowi GVHD, a zdolność do hamowania GVHD służy często jako miernik immunosupresyjnej działalności komórek regulatorowych.

W doświadczeniach na myszach, wykształcenie pełnej tolerancji na różne tkanki można uzyskać przez podawanie przeciwciał anti-CD4 (niepowodujących lizy komórek) w połączeniu z przeciwciałami anti-CD8 (uniemożliwia to zaktywowanie komórek cytotoksycznych) lub anti-CD154 [74] (CD154 czyli CD40L to ligand cząsteczki CD40 znajdującej się na APC; zastosowanie przeciwciał anti-CD154 uniemożliwia przekazywanie sygnału tą drogą). W różnych modelach transplantacyjnych wskazuje się na inne mechanizmy, dzięki którym terapia przeciwciałami anti-CD4 przyczynia się do akceptacji przeszczepu, jednak prawdopodobnie zasadniczą rolę odgrywa „zaraźliwa” tolerancja względem antygenów dawcy, promowana przez rozwijające się w tych warunkach regulatorowe limfocyty CD4⁺. Dobre wyniki otrzymuje się też po zastosowaniu przeciwciał anti-CD4 powodujących lizę komórek, podawanych tylko w czasie transplantacji – powoduje to przejściową eliminację limfocytów CD4⁺ odpowiadających na antygeny dawcy, co stwarza możliwość aktywacji i ekspansji dostatecznej liczby komórek regulatorowych, by mogły regulować efektorowe limfocyty T *in vivo*.

Inną metodą skuteczną w indukowaniu długotrwałej akceptacji przeszczepów (także u ludzi) jest transfuzja krwi typu dawcy przed dokonaniem przeszczepu. Dzięki istnie-

niu zjawiska „łączonej” supresji, wystarczy podać biorcy krew zawierającą co najmniej jeden antygen MHC obecny w przeszczepianym organie by zaindukować brak odpowiedzi na inne antygeny przeszczepu, przy czym antygeny dawcy mogą być całkowicie niezgodne z antygenami biorcy [75]. Korzystny wynik transfuzji zależy jednak od czasu jej dokonania – transfuzja krwi dawcy może bowiem uczulić biorcę na antygeny dawcy. Zgodnie z wynikami badań na myszach, podanie krwi na 2 dni przed transplantacją (w połączeniu z przejściową terapią anti-CD4) nie uczula myszy i indukuje długotrwałą akceptację przeszczepu, nawet ksenogenicznego, natomiast transfuzja dokonana 7–14 dni przed przeszczepieniem organu prowadzi do odrzucania nadostrego [13]. Naukowcom nie udało się jeszcze dokładnie określić, w jaki sposób transfuzja indukuje swoistą względem dawcy tolerancję transplantacyjną, jednak istnieją niekwestionowane dowody na to, że zjawisko to wiąże się z aktywacją regulatorowych limfocytów DN biorcy. Obserwuje się znacznie podwyższony poziom DN obwodowych, które są antygenowo swoiste i preferencyjnie migrują do przeszczepionej tkanki, stanowiąc większość limfocytów zasiedlających akceptowane narządy [80]. Komórki te zapobiegają też wystąpieniu GVHD [79].

Zaobserwowano, że najlepsze wyniki otrzymuje się w przypadku leczenia składającego się zarówno z transfuzji krwi, jak i krótkiej terapii przeciwciałami anti-CD154 [5,76].

Wreszcie można podawać same komórki regulatorowe po ich namnożeniu *ex vivo*. Wykazano, że tak namnożone komórki Trn muszą otrzymać powtórna stymulację przez TCR by przeżyć i móc wywierać ochronny wpływ na GVHD [72]. Dlatego skuteczną ochronę przed GVHD zapewniają tylko komórki regulatorowe swoiste względem antygenów biorcy (komórki stymulowane *in vitro* antygenami innymi niż biorcy dają jedynie ograniczoną ochronę przed GVHD). Tłumaczyć to należy prawdopodobnie tym, że działanie regulatorowe wywoływane przez swoiste komórki regulatorowe może być skierowane w głównej mierze na limfocyty efektorowe dawcy rozpoznające antygeny biorcy. Oczyszczone komórki Trn biorcy stymuluje się *in vitro* napromieniowanymi APC prezentującymi alloantygeny typu dawcy. Wygenerowane komórki utrzymują typowy fenotyp regulatorowy CD4⁺CD25⁺CD62L^{high} nawet po kilku tygodniach hodowli. Można spekulować, że komórki te preferencyjnie hamują ekspansję limfocytów T odpowiedzialnych za GVHD przy częściowym zachowaniu ekspansji limfocytów T nieodpowiadających na alloantygeny dawcy.

POTENCJALNE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA KOMÓREK REGULATOROWYCH W TERAPII

Możliwości indukcji i utrzymania tolerancji transplantacyjnej pochłaniają ostatnio uwagę wielu badaczy i klinicystów. Badania podstawowe czynią coraz większy postęp, natomiast większość prób klinicznych skupia się na ograniczeniu steroidów i inhibitorów kalcyneuryny oraz blokowaniu szlaku kostymulacji [43]. Inhibitory kalcyneuryny nie tylko wydają się hamować rozwój tolerancji, ale również uszkadzają nerki i są niezwykle kosztowne.

Nie udało się na razie jednoznacznie określić wpływu dostępnych leków immunosupresyjnych na same komórki re-

gulatorowe. Najczęściej stosowanymi inhibitorami kalcyneuryny są cyklosporyna A (CsA) i takrolimus (FK506). Leki z tej grupy hamują transkrypcję genu IL-2, hamują więc wydzielanie tej cytokiny. IL-2 jest niezbędna do aktywacji limfocytów, ale także do indukcji apoptozy limfocytów T efektorowych oraz - jak się wydaje - generowania obwodowych komórek CD4⁺CD25⁺ i pełnienia przez nie oraz komórki Trn funkcji supresorowych. Mechanizm działania innych stosowanych leków, np. rapamycyny i mykofenolanu mofetilu (MMF), polega na hamowaniu podziałów komórkowych. Następująca w wyniku działania tych leków blokada sygnału po związaniu IL-2 z receptorem wydaje się nie hamować wyżej wymienionych procesów, a często stosowane w laboratorium połączenie MMF z aktywną postacią witaminy D₃ wpływa pozytywnie na generowanie komórek CD4⁺CD25⁺ u myszy [1,15]. Badania na komórkach Trn, występujących u biorcy już przed przeszczepem, wykazały ich oporność na apoptozę powodowaną przez środki stosowane do indukcji tolerancji [16,23]. Może to być związane z ich stanem anergii i brakiem odpowiedzi na stymulację przez TCR czy IL-2.

Poszukuje się terapii, która nie tylko nie hamowałaby powstawania komórek regulatorowych, ale też wspomagała ich działanie. Jest to jednak utrudnione ze względu na niekompletne dane dotyczące mechanizmów działania komórek regulatorowych. Opracowano jednak metody prowadzące do generowania komórek regulatorowych w sposób pośredni. Jedną z nich jest połączenie witaminy D₃ z MMF, hamujące dojrzewanie DC. Do innych metod należy blokowanie oddziaływań CD40-CD154 [73] (terapia taka sprawdziła się również w przypadku małp [41], badania kliniczne na ludziach przerwano ze względu na komplikacje związane z trombocytami [42]) oraz podawanie przeciwciał anti-CD3 *in vivo* [29]. Wszystkie te terapie charakteryzują się brakiem swoistości działania, co stwarza duże ryzyko wystąpienia działań niepożądanych, większe niż w przypadku transferu odpowiedniej liczby samych komórek regulatorowych. Co najważniejsze, terapia polegająca na dokonaniu ekspansji komórek regulatorowych i ponownym wprowadzeniu do biorcy byłaby jednorazowa, ponieważ raz wygenerowane tolerujące komórki regulatorowe powinny, dzięki naturalnym mechanizmom, utrzymywać się na obwodzie w obecności antygenów przeszczepionej tkanki.

Ewentualnymi negatywnymi skutkami terapii komórkami regulatorowymi mogłoby być nadmierne wytwarzanie cytokin supresorowych (takich jak TGF-β i IL-10), prowadzące do zaburzenia homeostazy organizmu, a także zwiększona podatność na wystąpienie nowotworów.

Wyjściową populacją limfocytów T, które miałyby być zastosowane jako środek terapeutyczny u ludzi, należałoby wyizolować z krwi obwodowej. Niewielka liczba limfocytów DN, NKT czy TCRγδ w krwi obwodowej uniemożliwia wygenerowanie *in vitro* dostatecznie dużej liczby tych komórek do klinicznego zastosowania. Również komórek Trn jest na tyle mało, że należałoby wielokrotnie zwiększyć ich liczbę, aby mogły być zastosowane jako środek terapeutyczny.

Ważny dla ewentualnych korzyści terapeutycznych może być czas hodowli komórek. Komórki uczulane w obecności IL-2 i TGF-β i ponownie stymulowane IL-2 wykazywały wprawdzie silniejsze właściwości regulatorowe niż komór-

ki z pierwotnej hodowli *in vitro*, jednak ochronny wpływ *in vivo* komórek ponownie stymulowanych okazał się znacznie mniejszy (cyt. za [31]). Komórki regulatorowe mają prawdopodobnie ograniczone możliwości regeneracyjne i ich ekspansja *ex vivo* może wyczerpywać ich zdolności regulatorowe, ograniczając potencjał terapeutyczny.

Choć Trn są anergiczne, można uzyskać ich proliferację *in vitro*. Opisano metodę zwiększenia liczby komórek Trn *ex vivo* w obecności przeciwciał anti-CD3 oraz IL-2, jednak podanie ich myszom dawało jedynie ograniczoną ochronę przed GVHD [67]. Ta sama grupa badaczy wykazała, że choć stymulacja alloantygenem w obecności IL-2 i TGF-β nie powodowała proliferacji komórek, to jednak transfer zaledwie pół miliona tak stymulowanych komórek Trn zapewniał skuteczną ochronę przed GVHD. Istnieją doniesienia, że Trn silnie proliferują jeśli hoduje się je w obecności dużej liczby DC prezentujących antygen i utrzymują swoje funkcje *in vitro* [78]. Według innych badań, dodanie przeciwciał anti-CD3 i anti-CD28 powoduje ekspansję komórek Trn i zwiększa ich przeżywalność [66]. Istnieje więc szansa, że rzeczywiście można dokonać ekspansji tych komórek w taki sposób, że utrzymają swoje funkcje regulatorowe *in vivo* i będzie można ich użyć jako narzędzia terapeutycznego.

Stymulacja naiwnych limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ ludzi i myszy za pomocą niedojrzałych komórek dendrytycznych (a także powtarzana stymulacja IL-10 w przypadku komórek CD4⁺) prowadzi do powstania komórek regulatorowych typu T_R1. Komórki te wytwarzają duże ilości IL-10 i mogą też wytwarzać TGF-β. Wadą komórek T_R1 jako narzędzia terapeutycznego (podobnie jak komórek Trn) jest ich słaba zdolność do proliferacji [25]. Komórki te są anergiczne i miałyby prawdopodobnie krótki czas życia *in vivo*. Drugim problemem jest to, że anergiczny stan i zdolności supresorowe obu populacji komórek są przełamywane pod wpływem IL-2. Cytokina ta wytwarzana np. w odpowiedzi na czynnik zakaźny mogłaby więc niweczyć aktywność komórek regulatorowych. Grupa badaczy donosi jednak o wygenerowaniu w obecności przeciwciał anti-CD3 i anti-CD46 (CD46 jest regulatorem dopełniacza) wytwarzających IL-10 komórek T_R1, które nie były anergiczne i silnie proliferowały [38].

Stymulacja mitogenami, takimi jak przeciwciała anti-CD3 czy konkanawalina A, w obecności TGF-β prowadzi do powstania komórek TR2 z naiwnej populacji CD4⁺ i CD8⁺, u myszy i ludzi. Wykazano zdolność tych wytwarzających TGF-β komórek namnożonych *ex vivo* do ochrony przed chorobami autoimmunizacyjnymi u myszy [14].

Obecnie najlepszym kandydatem w terapii wydają się wygenerowane w obecności TGF-β i alloantygeny komórki CD4⁺CD25⁺ przypominające Trn. Okazało się, że stymulacja ludzkich komórek tego typu za pomocą IL-2 w kilka dni po aktywacji alloantygenem - kiedy wyraźnie zwiększyła się już ekspresja CD25, CTLA-4 i CD45RO, a komórki były zdolne do supresji zależnej od bezpośredniego kontaktu i niezależnej od cytokin - nie tylko nie neutralizuje zdolności supresorowych, ale wręcz je wzmacnia [77]. Ponadto, jak wspomniano wyżej, komórki takie mogą indukować „zaraźliwą” tolerancję - zachodzenie tego procesu umożliwiłoby zwielokrotnienie efektu terapeutycznego

po podaniu pacjentowi komórek. W innym doświadczeniu badano ekspansję *in vivo* wygenerowanych w jednocześnie obecności TGF- β i IL-2 komórek CD4⁺CD25⁺ po wprowadzeniu do myszy [82]. Dzięki wyznaczeniu komórek zaobserwowano, że wprowadzone komórki przechodziły wiele rund proliferacyjnych. Śledziona myszy poddanych zabiegowi zawierała większe ilości komórek CD4⁺CD25⁺ niż kontrolne. Jednorazowe podanie 5 milionów wygenerowanych komórek regulatorowych miało korzystny wpływ na przewlekłą reakcję przeszczep przeciwko gospodarzowi i skutkowało podwojeniem czasu życia myszy.

W najnowszych badaniach wykazano znaczny wzrost ekspresji mRNA dla Foxp3 i ekspresji białka w komórkach stymulowanych antygenem w obecności TGF- β *in vitro* (cyt. za [20]). Skoro Foxp3 jest czynnikiem wystarczającym do powstania komórek regulatorowych, określenie sygnałów czy mechanizmów prowadzących do zwiększenia ekspresji tego czynnika transkrypcyjnego ogromnie ułatwiłoby opracowanie ewentualnych terapii.

Rozpoczęto też poszukiwania optymalnych tolerogennych komórek dendrytycznych, które miałyby promować supresję odrzucania przeszczepu, jednak nie pojawiły się jeszcze doniesienia o żadnej obiecującej terapii.

PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że komórki regulatorowe odgrywają podstawową rolę w indukcji i utrzymaniu tolerancji organizmu, m.in. na antygeny przeszczepu. Możliwość powstawania komórek regulatorowych nie tylko w grasicy, ale również na obwodzie, stwarza coraz większe nadzieje na opracowanie przyszłych terapii stosowanych w celu in-

dukcji tolerancji transplantacyjnej. Naukowcy starają się opracować metody pozwalające na optymalne wykorzystanie naturalnie występujących komórek regulatorowych lub na indukcję powstawania takich komórek w organizmie, a także terapie polegające na namnożeniu wyizolowanych komórek *ex vivo* i ponownym wprowadzeniu do organizmu. Zaletami stosowania komórek regulatorowych byłaby możliwość zastosowania indywidualnej terapii dla każdego pacjenta oraz to, że dzięki istnieniu mechanizmów ograniczających ich działanie komórki te nie powinny powodować ogólnoustrojowych skutków ubocznych, typowych dla powszechnie stosowanych leków immunosupresyjnych (wiele tradycyjnych leków immunosupresyjnych prawdopodobnie uniemożliwia wykształcenie swoistej względem antygenów przeszczepu tolerancji).

Wydaje się, że mechanizm działania komórek regulatorowych zależy od mikrośrodowiska, w którym się znajdują, okoliczności, w jakich doszło do aktywacji (rodzaju antygeny i uczulającej komórki prezentującej antygen oraz obecnych cytokin) i być może również od tego, czy powstały w grasicy czy na obwodzie. Prawdopodobnie w tym należy upatrywać przyczyny tak niespójnych wyników badań dotyczących komórek regulatorowych.

Komórki regulatorowe mogą brać czynny udział nie tylko w akceptacji przeszczepu, ale również w hamowaniu patologicznych reakcji organizmu, jakimi są choroby autoimmunologiczne, alergię czy zaburzenia powstałe w wyniku chronicznych infekcji. Dlatego choć na razie wiele kwestii pozostaje jeszcze niewyjaśnionych, ogromnie zainteresowanie komórkami regulatorowymi powinno w najbliższych latach doprowadzić do opracowania metod pozwalających na ich terapeutyczne wykorzystanie.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adorini L., Giarratana N., Penna G.: Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 127–134
- [2] Akbari O., DeKruyff R.H., Umetsu D.T.: Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature Immunol.*, 2001; 2: 725–731
- [3] Aluvihare V.R., Kallikourdis M., Betz A.G.: Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature Immunol.*, 2004; 5: 266–271
- [4] Annacker O., Pimenta-Araujo R., Buren-Defranoux O., Barbosa T.C., Cumano A., Bandeira A.: CD25⁺CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through production of IL-10. *J. Immunol.*, 2001; 166: 3008–3018
- [5] Appel M.C., Banuelos S.J., Greiner D.L., Shultz L.D., Mordes J.P., Rossini A.A.: Prolonged survival of neonatal porcine islet xenografts in mice treated with a donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody. *Transplantation*, 2004; 77: 1341–1349
- [6] Asano M., Toda M., Sakaguchi N., Sakaguchi S.: Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 387–396
- [7] Azuma T., Takahashi T., Kunisato A., Kitamura T., Hirai H.: Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res.*, 2003; 63: 4516–4520
- [8] Baecher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.: Inhibition of human CD4⁺CD25⁺high regulatory T cell function. *J. Immunol.*, 2002; 169: 6210–6217
- [9] Bensinger S.J., Bandeira A., Jordan M.S., Caton A.J., Laufer T.M.: Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells. *J. Exp. Med.*, 2001; 194: 427–438
- [10] Bushell A., Morris P.J., Wood K.J.: Induction by operational tolerance by random blood transfusion combined with anti-CD4 antibody therapy. A protocol with significant clinical potential. *Transplantation*, 1994; 58: 133–139
- [11] Cederbom L., Hall H., Ivars F.: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.*, 2000; 30: 1538–1543
- [12] Chang C.C., Ciubotariu R., Manavalan J.S., Yuan J., Colovai A.I., Piazza F., Lederman S., Colonna M., Cortesini R., Dalla-Favera R., Suci-Foca N.: Tolerization of dendritic cells by Ts cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT-3 and ILT-4. *Nature Immunol.*, 2002; 3: 237–243
- [13] Chen W., Ford M.S., Young K.J., Cybulsky M.I., Zhang L.: Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J. Immunol.*, 2003; 170: 1846–1853
- [14] Chen Y., Kuchroo V.K., Inobe J., Hafler D.A., Weiner H.L.: Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 1994; 265: 1237–1240
- [15] Chiffolleau E., Walsh P.T., Turka L.: Apoptosis and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.*, 2003; 193: 124–145
- [16] Ciubotariu R., Vasilescu R., Ho E., Cinti P., Cancedda C., Poli L., Late M., Liu Z., Berloco P., Cortesini R., Suci-Foca Cortesini N.: Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts. *Hum. Immunol.*, 2001; 62: 15–20
- [17] de la Rosa M., Rutz S., Dorminger H., Scheffold A.: Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.*, 2004; 34: 2480–2488
- [18] Fisson S., Darasse-Jeze G., Litvinova E., Septier F., Klatzmann D., Liblour R., Salomon B.L.: Continuous activation of autoreactive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 737–746

- [19] Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y.: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunol.*, 2003; 4: 330–336
- [20] Fontenot J.D., Rudensky A.Y.: Molecular aspects of regulatory T cell development. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 73–80
- [21] Gomes N.A., Galattass C.R., Barreto-de-Souza V., Wilson M.E., DosReis G.A.: TGF- β mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. *J. Immunol.*, 2000; 164: 2001–2008
- [22] Gorczynski R., Hadidi S., Yu G., Clark D.A.: The same immunoregulatory molecules contribute to successful pregnancy and transplantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2002; 48: 18–26
- [23] Graca L., Thomson S., Lin C.Y., Adams E., Cobbold S.P.: CD25+CD4+ and CD25+CD4- regulatory T cells mediate dominant transplantation tolerance. *J. Immunol.*, 2002; 168: 5558–5565
- [24] Gregori S., Casorati M., Amuchastegui S., Smirolto S., Davalli A.M., Adorini L.: Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J. Immunol.*, 2001; 167: 1945–1953
- [25] Groux H.: Type 1 T regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation*, 2003; 75: 8S–12S
- [26] Groux H., Fournier N., Cottrez F.: Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 99–106
- [27] Hamano K., Rawsthorne M.A., Bushell A.R., Morris P.J., Wood K.J.: Evidence that the continued presence of the organ graft and not peripheral donor microchimerism is essential for the maintenance of tolerance to alloantigen in anti-CD4 treated recipients. *Transplantation*, 1996; 62: 856–860
- [28] Hara M., Kingsley C.I., Niimi M., Read S., Turvey S.E., Bushell A.R., Morris P.J., Powrie F., Wood K.J.: IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens *in vivo*. *J. Immunol.*, 2001; 166: 3789–3796
- [29] Herold K.C., Burton J.B., Francois F., Poumian-Ruiz E., Glandt M., Bluestone J.A.: Activation of human T cells by FcR nonbinding anti-CD3 mAb, hOKT3 γ 1(Ala-Ala). *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 409–418
- [30] Hori S., Nomura T., Sakaguchi S.: Control of regulatory T cell development by transcription factor FOXP3. *Science*, 2003; 299: 1057–1061
- [31] Horwitz D.A., Zheng S.G., Gray J.H., Wang J., Otsuka K., Yamagiwa S.: Regulatory T cells generated *ex vivo* as an approach for the therapy of autoimmune disease. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 135–143
- [32] Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N., Kuniyasu Y., Shimizu J., Otsuka F., Sakaguchi S.: Thymus and autoimmunity: production of CD4+CD25+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.*, 1999; 162: 5317–5326
- [33] Iwasaki A., Kelsall B.L.: Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.*, 1999; 190: 229–239
- [34] Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman E., Stassen M., Knop J., Enk A.H.: Infectious tolerance: human CD25+ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4+ T helper cells. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 255–260
- [35] Jonuleit H., Schmitt E., Schuler G., Knop J., Enk A.H.: Induction of interleukin-10 producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic human immature dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2000; 192: 1213–1222
- [36] Jordan M.S., Boesteanu A., Reed A.J., Petone A.E., Hohenbeck A.E., Leman M.A., Naji A., Caton A.J.: Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunol.*, 2001; 2: 301–306
- [37] Jordan M.S., Riley M.P., von Boehmer H., Caton A.J.: Anergy and suppression regulate CD4+ T cell responses to a self peptide. *Eur. J. Immunol.*, 2000; 30: 136–144
- [38] Kemper C., Chan A.C., Green J.M., Brett K.A., Murphy K.M., Atkinson J.P.: Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T regulatory cell 1 phenotype. *Nature*, 2003; 421: 388–392
- [39] Khatri R., Cox T., Yasako S.A., Ramsdell F.: An essential role for scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunol.*, 2003; 4: 337–342
- [40] Kingsley C.I., Karim M., Bushell A.R., Wood K.J.: CD4+CD25+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J. Immunol.*, 2002; 168: 1080–1086
- [41] Kirk A.D., Burkly L.C., Batty D.S., Baumgartner R.E., Berning J.D., Buchanan K., Fechner J.H.Jr., Germond R.L., Kampen R.L., Patterson N.B., Swanson S.J., Tadaki D.K., TenHoor C.N., White L., Knechtle S.J., Harlan D.M.: Treatment with humanised monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nature Med.*, 1999; 5: 686–693
- [42] Kirk A., Knechtle S., Sollinger H., Vincenti F., Stecher S.: Preliminary results of the use of humanized anti-CD154 in human renal allotransplantation. *Am. J. Transplant.*, 2001; 1 (Supl.1): 190
- [43] Knechtle S.J.: Clinical trials: where are we now? *Immunol. Rev.*, 2003; 196: 237–246
- [44] Levings M.K., Sangregorio R., Sartirana C., Moschin A.L., Battaglia M., Orban P.C., Roncarolo M.G.: Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor β , but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 1335–1346
- [45] Lin C.-Y., Graca L., Cobbold S., Waldmann H.: Dominant transplantation tolerance impairs CD8+ T cell function but not expansion. *Nature Immunol.*, 2002; 3: 1208–1213
- [46] Maeda H., Kuwahara H., Ichimura Y., Ohtsuki M., Kurakata S., Shiraishi A.: TGF- β enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 1995; 155: 4926–4932
- [47] Maldonado-Lopez R., De Smedt T., Michel P., Godfroid J., Pajak B., heiman C., Urban J., Moser M.: CD8 α + and CD8 α - subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 587–592
- [48] Malek T.R., Yu A., Vincek V., Scibelli P., Kong L.: CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2R β -deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 2002; 17: 167–178
- [49] McHugh R.S., Whitters M.J., Piccirillo C.A., Young D.A., Shevach E.M., Collins M., Byrne M.C.: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 2002; 16: 311–323
- [50] Nakamura K., Kitani A., Fuss I., Pedersen A., Harada N., Nawata H., Strober W.: TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ activity in both humans and mice. *J. Immunol.*, 2004; 172: 834–842
- [51] Nakamura K., Kitani A., Strober W.: Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . *J. Exp. Med.*, 2001; 194: 629–644
- [52] Papiernik M., do Carmo Leite-de-Moraes M., Pontoux C., Joret A.-M., Rocha B., Penit C., Dy M.: T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *J. Immunol.*, 1997; 158: 4642–4653
- [53] Papiernik M., Leite de Moraes M., Pontoux C., Vasseur F., Penit C.: Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R α chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int. Immunol.*, 1998; 10: 371–378
- [54] Piccirillo C.A., Letterio J.J., Thornton A.M., McHugh R.S., Mamura M., Mizuhara H., Shevach E.M.: CD4+CD25+ regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor- β 1 production and responsiveness. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 237–246
- [55] Pontoux C., Banz A., Papiernik M.: Natural CD4 CD25+ regulatory T cells control the burst of superantigen-induced cytokine production: the role of IL-10. *Int. Immunol.*, 2002; 14: 233–239
- [56] Qian S., Li W., Li Y., Fu F., Lu L., Fung J.J., Thomson A.W.: Systemic administration of cellular interleukin-10 can exacerbate cardiac allograft rejection in mice. *Transplantation*, 1996; 62: 1709–1714
- [57] Qin L., Chavin K., Ding Y., Tahara H., Favaro J., Woodward J.E., Suzuki T., Robbins P.D., Lotze M.T., Bromberg J.S.: Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival. *J. Immunol.*, 1996; 156: 2316–2323
- [58] Romagnoli P., Hudrisier D., van Meervijk J.: Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2002; 168: 1644–1648
- [59] Roncarolo M.G., Levings M.K., Travesari C.: Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: F5–F9
- [60] Sakaguchi S.: Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express Toll-like receptors. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 397–401

- [61] Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M.: Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 1995; 155: 1151–1164
- [62] Sanchez-Fueyo A., Weber M., Domenig C., Strom T.B., Zheng X.X.: Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. *J. Immunol.*, 2002; 168: 2274–2281
- [63] Taams L.S., Smith J., Rustin M.H., Salmon M., Poulter L.W., Akbar A.N.: Human anergic/suppressive CD4+CD25+ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur. J. Immunol.*, 2001; 31: 1122–1131
- [64] Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Iwata M., Shimizu J., Sakaguchi S.: 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
- [65] Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S.: Immunologic self-tolerance maintained by CD4+CD25+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.*, 2000; 192: 303–310
- [66] Tang Q., Henriksen K.J., Boden E.K., Tooley A.J., Ye J., Subudhi S.K., Zheng X.X., Strom T.B.: Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2003; 171: 3348–3352
- [67] Taylor P.A., Lees C.J., Blazar B.R.: The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 2002; 99: 3493–3499
- [68] Thomson A.W., Drakes M.L., Zahorchak A.F., O'Connell P.J., Steptoe R.J., Qian S., Lu L.: Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation. *J. Leukoc. Biol.*, 1999; 66: 322–330
- [69] Thornton A.M., Shevach E.M.: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.*, 1998; 188: 287–296
- [70] Thornton A.M., Shevach E.M.: Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.*, 2000; 164: 183–190
- [71] Tone M., Tone Y., Adams E., Yates S.F., Frewin M.R., Cobbold S.P., Waldmann H.: Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is co-stimulatory for T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 15059–15064
- [72] Trenado A., Charlotte F., Fisson S., Yagello M., Klatzmann D., Salomon B.L., Cohen J.L.: Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 1688–1696
- [73] van Maurik A., Herber M., Wood K.J., Jones N.D.: Cutting edge: CD4+CD25+ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8+ T cell mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J. Immunol.*, 2002; 169: 5401–5404
- [74] Waldmann H., Cobbold S.: Regulating the immune response to transplants. A role for CD4+ regulatory cells? *Immunity*, 2001; 14: 399–406
- [75] Wong W., Morris P., Wood K.: Pretransplant administration of a single donor class I MHC molecule is sufficient for the indefinite survival of fully allogeneic cardiac allografts: evidence for linked epitope suppression. *Transplantation*, 1997; 63: 1490–1494
- [76] Xu H., Montgomery S.P., Preston E.H., Tadaki D.K., Hale D.A., Harlan D.M., Kirk A.D.: Studies investigating pretransplant donor-specific blood transfusion, rapamycin, and the CD154-specific antibody IDEC-131 in a nonhuman primate model of skin allotransplantation. *J. Immunol.*, 2003; 170: 2776–2782
- [77] Yamagiwa S., Gray J.D., Hashimoto S., Horwitz D.A.: A role for TGF- β in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J. Immunol.*, 2001; 166: 7282–7289
- [78] Yamazaki S., Iyoda T., Tarbell K., Olson K., Velinon K., Imaba K., Steinman R.M.: Direct expansion of functional CD4+CD25+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 235–247
- [79] Young K.J., DuTemple B., Phillips M.J., Zhang L.: Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2003; 171: 134–141
- [80] Young K.J., Yang L., Phillips M.J., Zhang L.: Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood*, 2002; 100: 3408–3414
- [81] Zhang Z.X., Stanford W.L., Zhang L.: Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2002; 32: 1584–1592
- [82] Zheng S.G., Wang J.H., Gray J.D., Soucier H., Horwitz D.A.: Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: role of IL-2, TGF- β and IL-10. *J. Immunol.*, 2004; 172: 5213–5221
- [83] Zheng S.G., Wang J.H., Koss M.N., Quismorio F.Jr., Gray J.D., Horwitz D.A.: CD4+ and CD8+ regulatory T cells generated *ex-vivo* with IL-2 and TGF- β suppress a stimulatory graft-versus-host disease with a lupus-like syndrome. *J. Immunol.*, 2004; 173: 1531–1539