

Received: 2005.05.04
Accepted: 2005.06.24
Published: 2005.08.08

Limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺: fizjologia i rola tych komórek w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej*

CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells: their physiology and role in modulating immune response

Przemysław Lewkowicz¹, Natalia Lewkowicz², Henryk Tchórzewski¹

¹ Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

² Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Poznanie mechanizmów zarządzających działaniem układu immunologicznego jest niezbędne do zrozumienia immunopatogenezy wielu chorób. Zagadnienie skutecznej regulacji odpowiedzi immunologicznej jest przedmiotem licznych badań, dzięki czemu w ostatnich latach poszerzyła się wiedza dotycząca limfocytów T regulatorowych CD4⁺CD25⁺. Komórki te hamują proliferację limfocytów efektorowych, jak i wydzielanie przez nie cytokin prozapalnych. Limfocyty Treg działają bezpośrednio na zasadzie kontaktu komórka-komórka, a także najprawdopodobniej przez wytwarzanie TGF-β. Postuluje się, iż limfocyty T regulatorowe mogą również indukować limfocyty Tsup, poprzez które oddziałują na wszystkie komórki układu immunologicznego. Dzięki temu limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺ są odpowiedzialne za kontrolowanie i hamowanie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, zwłaszcza w stosunku do własnych antygenów. Komórki te pełnią ważną rolę w immunologii nowotworów, przeszczepów alogenicznych, patogenezie chorób autoimmunizacyjnych oraz alergicznych. W oparciu o przegląd dotychczasowych badań przeprowadzonych na komórkach mysich i ludzkich, opisano pochodzenie, fenotyp i funkcje limfocytów T regulatorowych CD4⁺CD25⁺. W pracy przedstawiono ponadto hipotezy działania limfocytów regulatorowych w warunkach *in vivo*, jako komórek odgrywających główną rolę w utrzymaniu homeostazy układu immunologicznego.

Słowa kluczowe: limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺

Summary

Understanding the role of immune system homeostatic balance is crucial for a better understanding of the pathogenesis of many diseases. The efficient regulation of immune response has been recently investigated in numerous studies that emphasize the important role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. These regulatory cells suppress the proliferation and cytokine secretion of effector cells directly via cell-cell contact and probably indirectly via TGF-β. This makes T regulatory cells responsible for the control and suppression of inappropriate immune response to self antigens. Moreover, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells have an important function in the immunopathology of cancer, allotransplantation, and allergy. Based on murine and human studies, this review presents a characterization of the origin, phenotype, and function of CD4⁺CD25⁺ regu-

* Praca finansowana w ramach grantów KBN nr 3 P05A 067 25 oraz nr 2 P05E 091 26

ry T cells. In addition, we show a hypothetical mode of the *in vivo* action of regulatory T cells, which play a central role in maintaining immune homeostasis

Key words: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7852.pdf

Word count: 3265

Tables: 1

Figures: 3

References: 50

Adres autora: dr n. med. Przemysław Lewkowicz, Zakład Immunologii Klinicznej I-CZMP w Łodzi, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź, e-mail: natalewk@wp.pl

Rozróżnianie antygenów własnych i obcych przez komórki immunokompetentne umożliwia skuteczną odpowiedź układu immunologicznego w stosunku do patogenów i zapobiega rozwojowi procesów autoimmunizacyjnych. Regulacja odpowiedzi immunologicznej w stosunku do różnego typu antygenów przebiega na wielu płaszczyznach, obejmując mechanizmy tolerancji na poziomie centralnym i obwodowym. Pomimo delecji tymocytów autoreaktywnych w grasicy, we krwi obwodowej osób zdrowych są obecne limfocyty autoreaktywne, które w specyficznych warunkach mogą zostać aktywowane [10]. W takich okolicznościach, zadziałanie mechanizmu hamującego wybiórczo aktywowane limfocyty autoreaktywne, niewpływającego na odpowiedź przeciwwakaźną, jest konieczne do prawidłowego funkcjonowania układu immunologicznego. W świetle wyników badań z ostatnich lat rolę „strażników” tolerancji obwodowej mogą pełnić limfocyty T CD4⁺ ze stałą ekspresją receptora dla łańcucha α IL-2 (CD25).

Po raz pierwszy subpopulacja limfocytów pomocniczych mająca zdolność hamowania funkcji innych komórek immunokompetentnych została opisana na początku lat siedemdziesiątych ub.w. przez Gershona [15,16]. Przez kolejne dekady lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych XX w. subpopulację tych komórek określano mianem limfocytów supresorowych, jednakże próby jej bliższego scharakteryzowania, zarówno pod względem fenotypowym, jak i funkcjonalnym napotkały duże trudności. Przełomem okazały się prace Sakaguchiego i wsp., którzy w 1995 r. odkryli, iż komórkami odpowiedzialnymi za hamowanie rozwoju autoimmunizacji u myszy są limfocyty T pomocnicze, które na swej powierzchni mają receptor łańcucha α IL-2 (CD25) [34]. W badaniach tych z grasicy i śledziony myszy transgenicznych BALB/c nu/pobrano limfocyty T, z których wyeliminowano subpopulację CD25⁺ przez dodanie przeciwciał monoklonalnych anti-CD25. W następnym etapie wszczepiono te komórki do węzłów chłonnych myszy transgenicznych BALB/c athymic nude (nu/nu), co spowodowało wystąpienie u wszystkich zwierząt chorób autoimmunizacyjnych narządowo swoistych (m.in. autoimmunizacyjne zapalenie tarczycy, żołądka, ślinianek, wysp trzustkowych, nadnerczy, jajnika, kłębuszkowe zapalenie nerek oraz zapalenie wielostawowe), potwierdzonych histologicznie i serologicznie. Rekonstrukcja subpopulacji limfocytów T CD4⁺CD25⁺ u badanych myszy w krótkim czasie od chwili wystąpienia pierwszych objawów chorobowych doprowadziła do ich ustąpienia.

Podobną fenotypowo subpopulację limfocytów T wykazano również u ludzi, a jej obecność stwierdzono m.in. w krwi obwodowej, grasicy, śledzionie, migdałkach i krwi pępowinowej [31]. Populacja limfocytów T CD4⁺CD25⁺ o właściwościach hamujących zyskała miano limfocytów T regulatorowych (Treg), mimo że sformułowanie „limfocyty supresorowe” wydaje się bardziej adekwatne. Niektórzy autorzy posługują się sformułowaniami „naturalnie występujące limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺” lub „limfocyty T regulatorowe z konstytutywną ekspresją CD25⁺” podkreślając ich odrębność w stosunku do aktywowanych limfocytów T CD4⁺. Ludzkie limfocyty Treg CD4⁺CD25⁺, podobnie jak komórki mysie, są limfocytami anergicznymi niereagującymi proliferacją na stymulację TCR (T-cell receptor). Są zdolne nie tylko do hamowania proliferacji i wydzielania cytokin przez limfocyty T CD4⁺CD25⁺, ale działają również supresyjnie w stosunku do limfocytów T CD8⁺, komórek NK i komórek dendrytycznych [12,45,29].

POWSTAWANIE I SELEKCJA KOMÓREK TREG W GRASICY

Proces powstawania Treg w grasicy jest mało poznany. Nie jest wyjaśnione, czy limfocyty Treg rozwijają się z odrębnych prekursorów komórkowych czy z niedojrzałych tymocytów CD4⁺. Podejrzewa się, iż w grasicy dochodzi do negatywnej selekcji tymocytów o fenotypie CD4⁺CD25⁺ w wyniku interakcji pomiędzy TCR o dużym powinowactwie na komórkach CD4⁺CD25⁺ i antygenów własnych prezentowanych w kontekście MHC klasy II na komórkach rdzenia grasicy [22]. Prawdopodobnie mechanizm selekcji limfocytów Treg niewiele odbiega od selekcji limfocytów T o innym fenotypie. Uważa się jednak, że powinowactwo receptorów TCR na tymocytach CD4⁺CD25⁺ do antygenów jest znacznie większe, niż na innych tymocytach, niemniej jednak nie na tyle duże, aby doszło do ich eliminacji [22]. Wniosek ten został potwierdzony wynikami badań przeprowadzonych na myszach podwójnie transgenicznych [25]. Autorzy wykazali, iż u myszy transgenicznych powstałych przez skrzyżowanie szczepu, wykazującego duże powinowactwo TCR dla hemaglutyniny (HA) wirusa grypy ze szczepem mającym wysoką ekspresję antygeny hemaglutyniny S1, odsetek tymocytów CD4⁺ z receptorem CD25⁺ w grasicy wynosił 30%, a w krwi obwodowej 50% limfocytów CD4⁺CD25⁺. W wyniku skrzyżowania szczepu myszy o małym powinowactwie TCR dla HA ze szczepem z wysoką ekspresją antygeny HA S1

Tabela 1. Zestawienie ekspresji markerów powierzchniowych oraz wewnątrzkomórkowych charakterystycznych dla ludzkich limfocytów regulatorowych CD4⁺CD25⁺ i limfocytów efektorowych CD4⁺CD25⁻ świeżo izolowanych i aktywowanych

Receptor	Treg świeżo izolowane (CD4 ⁺ CD25 ⁺)	Limfocyty efektorowe (CD4 ⁺ CD25 ⁻) świeżo izolowane	Treg aktywowane (CD4 ⁺ CD25 ⁺)	Limfocyty efektorowe (CD4 ⁺ CD25 ⁻) aktywowane
CTLA-4 wewnątrzkomórkowy	wysoka	niska	wysoka	wysoka
CTLA-4 powierzchniowy	niska	niska	wysoka	niska
CD25	wysoka	niska	wysoka	wysoka
CD45RO	wysoka	niska	wysoka	niska/średnia
CD45RA	niska	wysoka	niska	średnia
HLA-DR	wysoka	niska	wysoka	wysoka/średnia
CD122	wysoka	niska	wysoka	wysoka
CD134	wysoka	brak danych	brak danych	brak danych
LFA-3	średnia	brak danych	brak danych	brak danych
GITR	wysoka	niska	wysoka	wysoka
Foxp3 (jądrowy czynnik transkrypcyjny)	wysoka	brak danych	wysoka	brak danych

Opracowano na podstawie [19]

nie zaobserwowano zwiększenia populacji limfocytów T CD4⁺CD25⁺ na obwodzie. U myszy kontrolnych (szczep z wysoką ekspresją antygeny HA S1) stwierdzono obecność receptora CD25⁺ zaledwie na 13% obwodowych limfocytach CD4⁺.

Na skutek interakcji z komórkami nabłonkowymi grasicy, tymocyty CD4⁺CD25⁺ nabierają właściwości komórek anergicznym niewrażliwym na apoptozę, co zabezpiecza je przed delecją w procesie selekcji pozytywnej [2].

W procesie dojrzewania populacji limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ podkreśla się rolę takich receptorów i cytokin jak: CCR8, CD28, CD40, B7.1, B7.2, IL-2 i TGF-β, które są niezbędne do prawidłowego kształtowania i funkcjonowania tych komórek [2,21,27,35,36,37]. Oprócz zmian morfologicznych zachodzących na powierzchni komórki, limfocyty Treg „nabywają” swoisty dla komórek jądrocy czynnik transkrypcyjny Foxp3 [20]. Badania prowadzone na modelu zwierzęcym wykazały, iż mutacje w obrębie tego czynnika doprowadzają do utraty prawidłowej funkcji Treg, a w konsekwencji chorób autoimmunizacyjnych [14]. Badania Hori i wsp. wykazały, iż transfer za pomocą sondy retrowirusowej mRNA białka Foxp3 naiwnym komórkom T powoduje przejście ich w stan anergii i nabycie cech fenotypowych oraz czynnościowych komórek Treg, ze zdolnością do hamowania innych komórek układu immunologicznego włącznie. Limfocyty z pozytywnie wprowadzoną sondą mRNA białka Foxp3 przeciwdziałały rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych [20]. Potwierdzono również znaczenie ekspresji Foxp3 w rozwoju chorób autoimmunizacyjnych u ludzi. Mutacje w obrębie genu *Foxp3* zostały wykazane u ludzi z ciężkimi zaburzeniami immunologicznymi IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) [48]. Dodatkowo o roli polimorfizmu tego genu, jako bezpośredniej przyczyny chorób autoimmuniza-

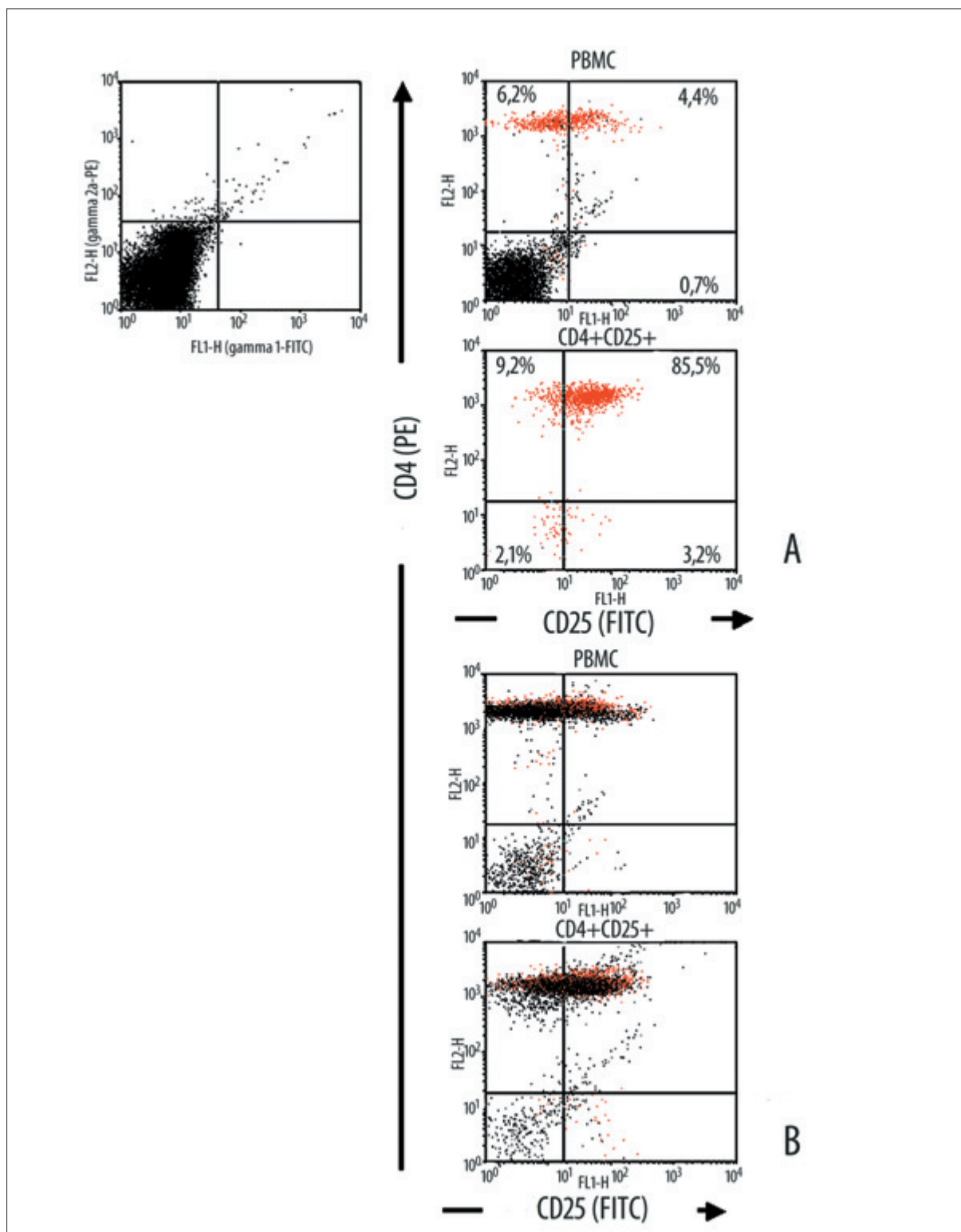
cyjnych, świadczą badania populacji Japończyków cierpiących na cukrzycę I, u których wykazano współistnienie polimorfizmu genu Foxp3 z tą chorobą [6].

ROZWÓJ KOMÓREK TREG POZA GRASICĄ

Badania Taamsa i wsp. wykazały, iż komórki regulatorowe mogą również powstawać poza grasicą [42]. Komórki Treg izolowane z krwi obwodowej wykazują niską ekspresję markerów CD45RB, CD95 oraz małe stężenie Bcl-2 charakterystycznych dla limfocytów T wysoce zróżnicowanych w wyniku stymulacji kilkukrotnej tym samym antygenem. Autorzy sugerują, iż komórki Treg mogą powstawać w rezultacie transformacji wysoce zróżnicowanych limfocytów T pamięci, podczas prezentacji limfocytom antygeny przez nieprofesjonalne komórki APCs. W doświadczeniu użyto wysoce zróżnicowane limfocyty T swoiste dla antygeny hemaglutyniny S1, które wykazywały ekspresję MHC klasy II i mogły prezentować sobie nawzajem antygen bez kostymulacji, w wyniku czego stawały się komórkami anergicznymi i spełniały kryteria komórek CD4⁺CD25⁺ Treg. Wyniki tych badań wskazują na możliwość powstawania komórek CD4⁺CD25⁺ Treg na obwodzie w specyficznych warunkach, przy braku kostymulacji przez profesjonalne APC [42].

Doświadczenia przeprowadzone w warunkach *in vitro* na limfocytach mysich i ludzkich potwierdzają możliwość powstawania limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ z limfocytów T CD4⁺CD25⁻. Takie zjawisko zostało odnotowane w hodowli komórek w obecności TGF-β oraz TGF-β i IL-2 [13,49]. Nowo powstałe limfocyty regulatorowe miały zarówno cechy fenotypowe, jak i czynnościowe naturalnie występujących limfocytów Treg.

Pomimo że limfocyty CD4⁺CD25⁺ były pierwotnie opisane jako komórki anergiczne, późniejsze badania wyka-



Ryc. 1. Etapy izolacji limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ z krwi pełnej. W pierwszym etapie wyizolowano wszystkie komórki jednojądrzaste (PBMC) przez wirowanie krwi pełnej na gradiencie gęstości. Następnie przeprowadzono selekcję negatywną z użyciem mieszaniny przeciwciał monoklonalnych (mAb) skoniugowanych biotyną (anty-CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγδ, glycophorin A) i przeciwciał skierowanych przeciw biotynie, w celu izolacji limfocytów CD4⁺ z całkowitej puli PBMC. Trzeci etap to selekcja pozytywna z użyciem nośników skoniugowanych z mAb anti-CD25. **A** – przykład izolacji, do której użyto małe ilości mAbs CD25 (2 μl/10⁷ komórek) na etapie selekcji pozytywnej z puli limfocytów CD4⁺. Wyizolowano komórki tylko o średniej i wysokiej ekspresji receptora CD25. Kolorem czerwonym oznaczono komórki podwójnie pozytywne. **B** – przykład izolacji, do której zastosowano zbyt duże ilości mAbs anti-CD25 na etapie selekcji pozytywnej z puli limfocytów CD4⁺ (10 μl/10⁷ komórek). Wyizolowano komórki zarówno o dużej, jak i małej ekspresji receptora CD25. Do izolacji wykorzystano odczynniki (CD4⁺CD25⁺ Regulatory T cell) oraz kolumny separacyjne (MACS S.C. LD, MACS S.C. MS) firmy Miltenyi Biotec, Niemcy

zały, iż komórki Treg są zdolne do proliferacji w obecności IL-2, INF- β oraz IL-15 [12,24,41]. Nowo powstałe limfocyty CD4⁺CD25⁺ zachowały zdolność do hamowania proliferacji świeżo izolowanych limfocytów efektorowych CD4⁺. Jednakże należy wspomnieć, iż zdolność Treg do proliferacji jest dużo mniejsza, niż limfocytów efektorowych CD4⁺CD25⁻ [12,24,39,41,43]. Proliferacja limfocytów Treg została potwierdzona również w badaniach *in vivo* na myszach transgenicznych, w których przedstawiono proliferację limfocytów regulatorowych na obwodzie pod wpływem stymulacji antygenem swoistym dla danego TCR [47].

Odkrycia dokonane w ostatnich latach, dotyczące możliwości generacji i ekspansji limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ w warunkach *in vitro*, umożliwiły rozpoczęcie badań nad zastosowaniem Treg do celów terapeutycznych.

CHARAKTERYSTYKA FENOTYPOWA LIMFOCYTÓW TREG CD4⁺CD25⁺ ORAZ METODY ICH IZOLACJI

Większość markerów powierzchniowych, takich jak CD25, CD45RO, CTLA-4, GITR, PD-L1 czy HLA-DR jest obecna zarówno na limfocytów regulatorowych CD4⁺CD25⁺, jak i aktywowanych limfocytach efektorowych CD4⁺ (tabela 1). Ludzkie limfocyty T CD4⁺CD25⁺, w odróżnieniu od limfocytów mysich, wykazują niską ekspresję cząsteczki CD25 i stanowią około 30% populacji limfocytów CD4⁺ w krwi obwodowej. Niektórzy autorzy zaproponowali, aby uznać jedynie limfocyty T CD4⁺CD25⁺ z wysoką ekspresją cząsteczki CD25, które stanowią 2–4% obwodowych limfocytów CD4⁺, za właściwe komórki o cechach regulatorowych [3]. Analiza fenotypowa wykazała, iż populacja limfocytów CD4⁺CD25^{high} jest bardziej jednorodna i 95% komórek wykazuje ekspresję CD45RO, CD62L oraz CD122. Sugeruje się, że limfocyty T CD4⁺CD25^{low} mogą być aktywowanymi *in vivo* limfocytami CD4⁺, dlatego też nie działają regulatorowo.

Obecnie jedynym markerem pozwalającym na izolację limfocytów regulatorowych CD4⁺CD25⁺ jest cząsteczka CD25. Pierwsza z metod umożliwia izolację komórek z użyciem nośników magnetycznych (magnetic beads) anti-CD25 na kolumnie separacyjnej. Wadą tej metody jest zanieczyszczenie populacji CD4⁺CD25^{high} komórkami o niskiej ekspresji CD25, które jest uzależnione od liczby użytych nośników magnetycznych w stosunku do liczby komórek w próbce (rycina 1).

Zbyt duża liczba dodanych przeciwciał anti-CD25 powoduje, iż otrzymana populacja komórek ma zarówno limfocyty o wysokiej jak i niskiej ekspresji CD25. Zanieczyszczenie komórkami o niskiej ekspresji CD25 bardzo często uniemożliwia prawidłową ocenę aktywności Treg w stosunku do limfocytów efektorowych. Prawdopodobnie jest to też przyczyną błędnego wnioskowania, iż limfocyty Treg działają poprzez sieć cytokin. W drugiej metodzie używa się cytometru przepływowego z funkcją sortera do izolacji wcześniej wyznakowanych komórek. Zaletą tej metody jest możliwość izolacji komórek w oparciu o intensywność ekspresji CD25, jednakże przejście pomiędzy ekspresją wysoką i niską jest płynne i bramkowanie komórek jest uzależnione od decyzji badacza.

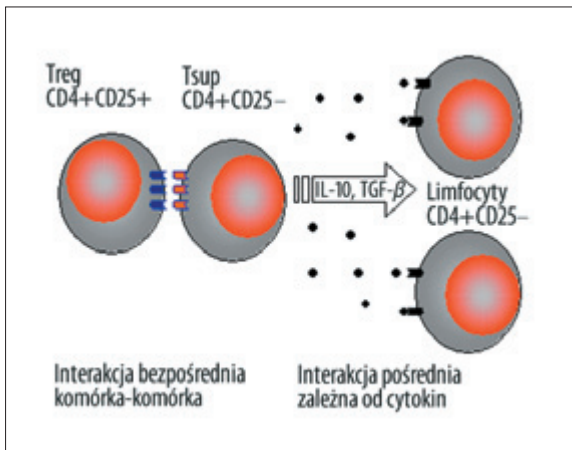
FUNKCJE LIMFOCYTÓW CD4⁺CD25⁺ W BADANIACH *IN VITRO*

Bezpośrednio działanie komórek regulatorowych można wykazać w mieszanych hodowlach z limfocytami efektorowymi CD4⁺CD25⁻ stymulowanymi poliklonalnie przez receptor TCR. W większości prac badawczych limfocyty CD4⁺CD25⁺ były dodawane do hodowli w zmniejszającej się liczbie do stałej liczby komórek efektorowych, co pozwalało rzetelnie ocenić właściwości hamujące limfocytów Treg. Najczęściej jako stymulatory stosowane były przeciwciała monoklonalne anti-CD3 w obecności kostymulacji anti-CD28 oraz komórek prezentujących antygen (APC) pozbawionych, przez radiologiczne naświetlenie dawką 3300 rad, możliwości proliferacji (assessory cells) [5]. Po 72-godzinnej lub dłuższej hodowli, mierzona była proliferacja komórek efektorowych testem inkorporacji [3H] tymidyny oraz stężenie uwalnianych cytokin. Zahamowanie proliferacji limfocytów T CD4⁺CD25⁻ w hodowlach o proporcjach 1:1 wynosiło według różnych autorów 50–90% [5]. Stwierdzono również znaczące obniżenie poziomu IL-2 oraz INF- γ w supernatantach pohodowlanych, jak i wewnątrzkomórkowy mRNA tych cytokin. Analiza poziomu stężenia IL-10 w supernatantach pohodowlanych wykazała również jego obniżenie, ale w znacznie mniejszym stopniu [24,26,39].

Aby limfocyty Treg mogły działać hamująco na inne komórki immunokompetentne, muszą uprzednio zostać pobudzone przez TCR. W dwóch niezależnych eksperymentach wykazano, że Treg pobudzone i następnie utrwalone paraformaldehydem były zdolne do hamowania proliferacji limfocytów CD4⁺CD25⁻ [11,23]. Ważne obserwacje zostały poczynione w badaniach, w których limfocyty T CD4⁺CD25⁻ i CD4⁺CD25⁺ były aktywowane stymulatorami o różnej sile, a następnie wspólnie hodowane. Wykazano, że limfocyty T CD4⁺CD25⁻, które uprzednio zostały poddane silnej stymulacji TCR były niewrażliwe na działanie Treg, natomiast siła stymulacji TCR komórek regulatorowych nie miała tak dużego wpływu na ich właściwości hamujące [4]. Jednakże stwierdzono, że w wyniku silnej aktywacji Treg zdolność tych komórek do hamowania proliferacji limfocytów CD4⁺CD25⁻ utrzymywała się przez krótszy czas, podczas gdy niewielka aktywacja Treg powodowała ich długotrwałą aktywność supresyjną [4].

CZYNNIKI WYDZIELANE PRZEZ SPOCZYNKOWE ORAZ POBUDZONE LIMFOCYTY TREG

Zarówno świeżo wyizolowane limfocyty T regulatorowe CD4⁺CD25⁺, jak i hodowane niestymulowane nie wytwarzają istotnych ilości cytokin. Dopiero po stymulacji komórki te zaczynają wydzielać niewielkie ilości IL-10, TGF- β i INF- γ [24,26,30,39]. Jednakże poziom wytwarzania tych cytokin jest dużo niższy, niż w przypadku hodowli limfocytów CD4⁺CD25⁻ o podobnych gęstościach i prowadzonych w podobnych warunkach stymulacji. Według niektórych badaczy subpopulacja komórek CD4⁺CD25^{high} nie wytwarza IL-10, TGF- β , IL-13, a także INF- γ , a otrzymane małe stężenia przez innych autorów są wynikiem kontaminacji komórkami efektorowymi, co jest szczególnie prawdopodobne, jeśli izolacja Treg odbywała się metodą z wykorzystaniem mAbs sprzężonych nośnikami magnetycznymi na kolumnach separacyjnych (rycina 1) [3].



Ryc. 2. Schemat teorii dwustopniowego działania limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ (infectious tolerance). W pierwszym etapie limfocyty Treg w kontakcie bezpośrednim z limfocytami T CD4⁺CD25⁻ indukują ich anergię i uwalnianie przez nie IL-10 i TGF-β. W ten sposób powstają anergiczne limfocyty Tsup, które w drugim etapie działają hamująco poprzez cytokiny na kolejne limfocyty CD4⁺CD25⁻.

MECHANIZMY ODDZIAŁYWANIA LIMFOCYTÓW TREG CD4⁺CD25⁺ NA KOMÓRKI EFEKTOROWE

W celu ustalenia mechanizmu działania limfocytów CD4⁺CD25⁺ na limfocyty efektorowe, komórki przedzielono membraną (φ 0,02 μm) uniemożliwiającą bezpośredni ich kontakt, a następnie hodowano w wyżej opisanych warunkach [12,24,31,34]. Wykazano, że w takim układzie badawczym limfocyty Treg nie działają hamująco na proliferację limfocytów CD4⁺CD25⁻, co sugeruje konieczność bezpośredniego kontaktu komórka-komórka dla spełnienia funkcji przez limfocyty Treg CD4⁺CD25⁺. Aby określić znaczenie IL-10 i TGF-β w modulowaniu funkcji innych komórek przez limfocyty Treg CD4⁺CD25⁺, do mieszanych hodowli dodawano odpowiednie przeciwciała blokujące dowodząc, iż cytokiny te odgrywają mniejszą, lub wręcz marginalną rolę w działaniu supresyjnym Treg [2,24,26,31,34,41]. Niemniej jednak ważne znaczenie może odgrywać TGF-β związany z błoną komórkową limfocytów Treg, który jest obecny na aktywowanych komórkach i może być odpowiedzialny za hamowanie czynności komórek w bezpośrednich interakcjach [30].

Ze względu na to, że limfocyty CD4⁺CD25⁺ oddziałują na inne komórki przez bezpośredni kontakt, dalsze badania skupiły się na analizie błonowych i wewnątrzkomórkowych receptorów, które mogłyby być odpowiedzialne za ich działanie hamujące. Niepobudzone komórki regulatorowe na swej powierzchni wykazują wysoką ekspresję receptora łańcucha α cytokiny IL-2 (CD25), dla łańcucha γ IL-2 (CD122), HLA-DR, CD45RO, wewnątrzkomórkowego receptora CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) oraz CD134 (OX40). Jedną z niewielu uchwytanych morfologicznych zmian zachodzących podczas aktywacji limfocytów CD4⁺CD25⁺ poprzez receptor TCR jest wzrost ekspresji receptora CTLA-4, który ulega przemieszczeniu z cytoplazmy na powierzchnię komórki. Zablockowanie CTLA-4 na limfocytach Treg prawdopodobnie uniemożliwia ich aktywację i skuteczne działanie w stosunku do

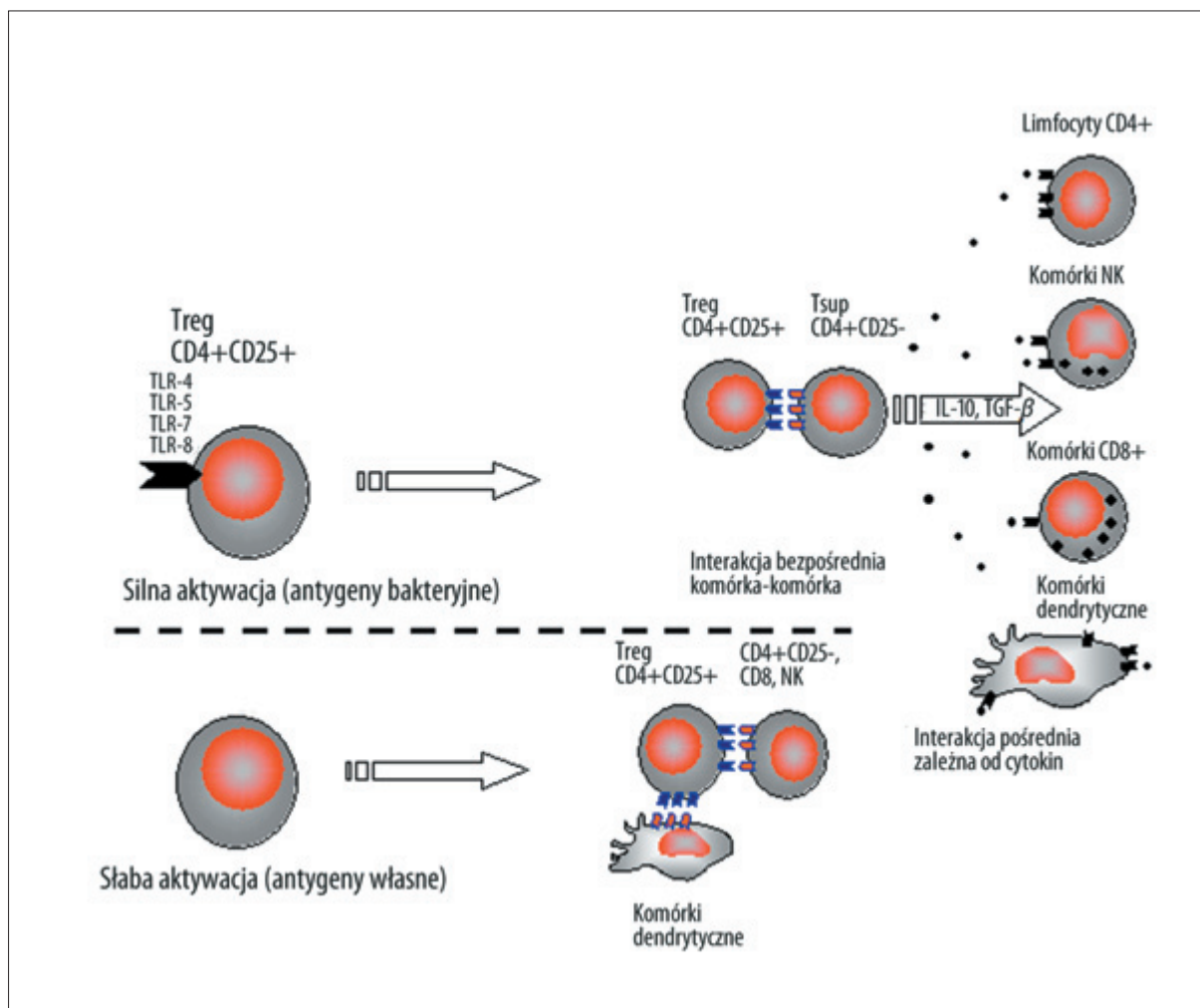
limfocytów efektorowych [33]. Ligandem białka CTLA-4 znajdującego się na powierzchni aktywowanego limfocyta Treg jest receptor B7 na komórkach docelowych. Wynikiem połączenia się białka CTLA-4 z receptorem B7 jest spadek wytwarzania IL-2 przez limfocyty bezpośrednio poddane działaniu Treg, co zostało uwidocznione w hodowlach *in vitro* [24,26,34,44]. W następstwie obniżenia uwalniania IL-2 następuje spadek proliferacji pozostałych limfocytów. Jednakże wyniki badań z użyciem przeciwciał monoklonalnych anti-CTLA-4 w hodowlach mieszanych limfocytów są sprzeczne i nie pozwalają na jednoznaczne określenie roli CTLA-4 [7,24,43,26].

Szczególne znaczenie w spełnieniu funkcji hamujących przez regulatorowe limfocyty CD4⁺CD25⁺ przypisuje się receptorowi GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor). W badaniach na myszach wykazano, iż zastosowanie przeciwciał monoklonalnych blokujących receptor GITR powoduje osłabienie właściwości inhibycyjnych komórek Treg w stosunku do populacji limfocytów CD4⁺CD25⁻ [38]. Zastosowanie przeciwciał blokujących GITR w hodowlach limfocytów ludzkich spowodowało jednakże mniejsze osłabienie supresji, niż w przypadku komórek mysich [4]. O roli tych receptorów może również świadczyć to, iż w podobnych układach doświadczalnych z próbami blokowania innych receptorów, m.in.: CD103, CTLA-4, 4-1BB, OX40, CD2, tylko mAb anti-GITR powodowały zniesienie funkcji Treg [19].

Innymi kandydatami receptorów odpowiedzialnych za właściwości hamujące limfocytów CD4⁺CD25⁺ mogą być cząsteczki PD-1 oraz Notch. Wprawdzie struktura i znaczenie tych receptorów w bezpośrednich interakcjach komórkowych jest dość słabo poznane, w badaniach na zwierzętach wykazano, iż pełnią one znaczącą rolę w regulacji tolerancji immunologicznej i kontroli procesów autoimmunizacyjnych. U myszy transgenicznych z brakiem receptora PD-1 rozwija się autoimmunizacyjne zapalenie kłębuszków nerkowych, zapalenie stawów i autoimmunizacyjna kardiomiopatia rozstrzeniowa [32]. Z kolei w badaniach na transgenicznych myszach Notch wykazano, iż są one odporne na indukcję autoimmunizacyjnego zapalenia wysp trzustkowych w porównaniu do szczepu „dzikiego”. Co ciekawe, jednocześnie zaobserwowano u tych myszy zwiększenie odsetka limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺, co pośrednio może sugerować udział receptora Notch w regulacji rozwoju i funkcjonowania limfocytów Treg [1].

Badania Gondeka i wsp. wykazały udział granzymu B (GZ-B), którego ekspresja wzrasta podczas pobudzenia limfocytów Treg, w supresji komórek efektorowych po kontakcie bezpośrednim [17]. Spostrzeżenia te zostały potwierdzone w badaniach funkcji limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ u myszy transgenicznych GZ-B^{-/-}, u których zaobserwowano zmniejszone właściwości hamujące tych komórek. Nie został natomiast potwierdzony udział perforyn, sugerowany we wcześniejszych badaniach innych autorów [18].

Kwestią otwartą nadal pozostaje w jaki sposób tak mała liczna populacja komórek jest w stanie nadzorować pozostałe komórki układu immunologicznego. Pewnym wyjaśnieniem może być teoria dwustopniowego działania Treg, zwana tolerancją zaraźliwą (infectious tolerance) [23]. W pierwszym etapie komórki Treg CD4⁺CD25⁺



Ryc. 3. Schemat działania limfocytów Treg CD4+CD25+ w zależności od rodzaju i immunogenności antygeny. Różnica w działaniu limfocytów Treg może wynikać z aktywacji tych komórek poprzez receptory TLR, co prowadzi do uruchomienia dodatkowego sygnału i drugiej fazy regulacji, zależnej od uwalnianych cytokin przez komórki Tsup indukowane w kontakcie bezpośrednim przez Treg. Autoantygeny są znacznie mniej immunogenne, w wyniku czego nie dochodzi prawdopodobnie do indukcji drugiej fazy hamowania zależnego od Tsup

w kontakcie bezpośrednim z limfocytami T CD4+CD25- indukują ich anergię i uwalnianie przez nie IL-10 i TGF-β. W ten sposób powstają anergiczne limfocyty Tsup, zdolne do wydzielania IL-10 i TGF-β, które w drugim etapie działają hamująco na kolejne limfocyty CD4+CD25- (ryc. 2). Hipoteza ta jest wynikiem obserwacji hodowli mieszanej limfocytów Treg CD4+CD25+ z limfocytami CD4+CD25-. Zaobserwowano mianowicie, iż po pewnym czasie z takiej hodowli można wyizolować limfocyty Treg CD4+CD25+ i anergiczne Tsup, zdolne do hamowania świeżo wyizolowanych limfocytów CD4+CD25- oraz stwierdzono znaczne ilości IL-10 i TGF-β w supernatantach pochodzących [11,23].

Działanie limfocytów Treg w warunkach *in vivo* wydaje się bardziej złożone. W badaniach na zwierzęcych modelach chorób autoimmunizacyjnych, takich jak autoimmunizacyjne zapalenie żołądka i wrzodziejące zapalenie jelita grubego, uzyskano sprzeczne dane dotyczące mechanizmu działania limfocytów Treg. W pierwszym przypadku wykazano, iż supresyjne działanie Treg nie jest związane z IL-4, IL-10, TGF-β, CTLA-4 [28], przeciwnie natomiast

w przypadku badań nad wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego udowodniono, iż zarówno IL-10, TGF-β, jak i CTLA-4 są niezbędne do uzyskania hamującego działania Treg [30,33,40]. Prawdopodobnie różnice te wynikają z rodzaju i immunogenności antygeny odpowiedzialnego za powstawanie zmian chorobowych. W przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego choroba jest indukowana przez silne antygeny bakteryjne flory saprofitycznej jelita (*Enterobacteriaceae*). Bakterie te poprzez receptory TLR (Toll-like receptors) są silnymi stymulatorami Treg, co prowadzi do uruchomienia dodatkowego sygnału i wspomnianej wcześniej drugiej fazy regulacji, zależnej od uwalnianych cytokin przez komórki Th^{sup} indukowane w kontakcie bezpośrednim przez Treg [8]. Natomiast w przypadku autoimmunizacyjnego zapalenia żołądka autoantygenem jest H⁺/K⁺-ATP-aza obecna na komórkach okładzinowych błony śluzowej. H⁺/K⁺-ATP-aza jest znacznie mniej immunogennym antygenem, w wyniku czego prawdopodobnie nie dochodzi do indukcji drugiej fazy hamowania zależnego od Th^{sup}. Wydaje się, że takie zróżnicowane działanie limfocytów Treg jest fizjologicznie uzasadnione. W zakażeniach bakteryjnych następuje silna aktywacja wielu komponent

układu immunologicznego, co niesie ze sobą zagrożenie powstania wstrząsu septycznego. W takiej sytuacji działanie limfocytów Treg musi objąć cały organizm, co może nastąpić jedynie poprzez sieć cytokin hamujących proces zapalny, IL-10 i TGF- β . W przypadku autoantygenów rola limfocytów Treg powinna się ograniczyć do neutralizacji komórek autoreaktywnych, bądź też komórek aktywowanych przez autoantygeny. Do takiej eliminacji limfocytów wystarczający może być kontakt bezpośredni z Treg, bez konieczności uruchamiania sieci cytokin. Hipotetyczny schemat działania komórek Treg w zależności od immunogenności antygeny przedstawiono na rycinie 3.

Inna teoria działania limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ została sformułowana przez Bacher-Allana i wsp. w oparciu o badania nad różnego typu stymulatorami TCR. Wskazują oni, iż w obecności silnego sygnału charakterystycznego dla odpowiedzi przeciwważnej limfocyty efektorowe są niewrażliwe na działanie limfocytów Treg, podczas gdy limfocyty autoreaktywne pobudzone autoantyzemem są bardziej wrażliwe na bezpośrednie działanie limfocytów regulatorowych [4].

Badania nad receptorami chemokin, występującymi na powierzchni limfocytów Treg, uzupełniają wiedzę dotyczącą ich migracji w kierunku komórek efektorowych. Sugeruje się, że komórki dendrytyczne przez wytwarzanie odpowiednich chemokin regulują dystrybucję limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ w organizmie [9].

PIŚMIENNICTWO

- [1] Anastasi E., Campese A.F., Bellavia D., Bulotta A., Balestri A., Pascucci M., Checquolo S., Gradini R., Lendahl U., Frati L., Gulino A., Di Mario U., Screpanti I.: Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J. Immunol.*, 2003; 171: 4504–4511
- [2] Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Lazzeri E., Manetti R., Vanini V., Romagnani P., Maggi E., Romagnani S.: Phenotype, localization and mechanism of suppression of CD4⁺CD25⁺ human thymocytes. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 379–387
- [3] Bacher-Allan C., Brown J.A., Freeman G.J., Hafler D.A.: CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.*, 2001; 167: 1245–1253
- [4] Bacher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A.: Inhibition of human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells function. *J. Immunol.*, 2002; 169: 6210–6217
- [5] Bacher-Allan C., Viglietta V., Hafler D.A.: Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Semin. Immunol.*, 2004; 16: 89–98
- [6] Bassuny W.M., Ihara K., Sasaki Y., Kuromaru R., Kohno H., Matsuura N., Hara T.: A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the Foxp3/Scurfin gene associated with type I diabetes. *Immunogenetics*, 2003; 55: 149–156
- [7] Birebent B., Lorho R., Lechartier H., de Guibert S., Alizadeh M., Vu N., Beauplet A., Robillard N., Semana G.: Suppressive properties of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur. J. Immunol.*, 2004; 34: 3485–3496
- [8] Caramalho I., Lopez-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J.: Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 2003; 197: 403–411
- [9] D'Ambrosio D., Sinigaglia F., Adorini L.: Special attractions for suppressor T cells. *Trends Immunol.*, 2003; 24: 122–126
- [10] Danke N.A., Koelle D.M., Yee C., Beheray S., Kwok W.W.: Autoreactive T cells in healthy individuals. *J. Immunol.*, 2004; 172: 5967–5972
- [11] Dieckmann D., Bruett C.H., Ploettner H., Lutz M.B., Schuler G.: Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, 2002; 196: 247–253
- [12] Dieckmann D., Ploettner H., Berchtold S., Berger T., Schuler G.: *Ex vivo* isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 1303–1310
- [13] Fantini M.C., Becker C., Monteleone G., Pallone F., Galle P.R., Neurath M.F.: Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁺ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.*, 2004; 172: 5149–5153
- [14] Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y.: Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2003; 4: 330–336
- [15] Gershon R.K., Kondo K.: Cell interaction in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 1970; 18: 723–737
- [16] Gershon R.K., Kondo K.: Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 1971; 21: 903–914
- [17] Gondek D.C., Lu L.F., Quezada S.A., Sakaguchi S., Noelle R.J.: Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.*, 2005; 174: 1783–1786
- [18] Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P., Ley T.J.: Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 2004; 21: 589–601
- [19] Holm T.L., Nielsen J., Claesson M.H.: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS*, 2004; 112: 629–641
- [20] Hori S., Nomura T., Sakaguchi S.: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299: 1057–1061
- [21] Huber S., Schramm C., Lehr H.A., Mann A., Schmitt S., Becker C., Protschka M., Galle P.R., Neurath M.F., Blessing M.: Cutting edge: TGF- β signaling is required for the *in vivo* expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Immunol.*, 2004; 173: 6526–6531
- [22] Itoh M., Takahashi T., Sakaguchi N., Kuniyasu Y., Shimizu J., Otsuka F., Sakaguchi S.: 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: 5317–5326

REGULACJA FUNKCJI LIMFOCYTÓW TREG CD4⁺CD25⁺

Nie ulega wątpliwości, że w tym złożonym systemie, jakim jest układ immunologiczny, limfocyty Treg muszą również podlegać czynnikom regulującym ich funkcje. Wskazuje się, że komórki APC mogą być odpowiedzialne za modyfikację działania limfocytów Treg. Zaobserwowano zahamowanie funkcji limfocytów CD4⁺CD25⁺ w obecności CD86, którego ekspresja jest zwiększona na dojrzałych komórkach dendrytycznych, natomiast obecność CD80, swoistego dla komórek dendrytycznych niedojrzałych, promowała zwiększenie właściwości supresyjnych limfocytów Treg [50]. Według innych autorów za modulację funkcji limfocytów Treg są odpowiedzialne receptory należące do rodziny TNFR OX40 (CD134) i GITR [46]. Użycie agonistów tych receptorów spowodowało zahamowanie działania supresyjnego limfocytów CD4⁺CD25⁺, umożliwiając proliferację limfocytów efektorowych i wytwarzanie cytokin.

W świetle współczesnych badań rola limfocytów Treg w kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznej jest bardzo znacząca. Zaburzenia pomiędzy fazą aktywacji a supresji w układzie immunologicznym wydają się obecne w patologii wielu chorób, często o odmiennym przebiegu klinicznym. Rozwój wiedzy na temat fizjologii i działania limfocytów Treg CD4⁺CD25⁺ umożliwi opracowanie nowych strategii terapeutycznych opartych o manipulację nad liczbą, funkcją czy też swoistością limfocytów Treg.

- [23] Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H., 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
- [24] Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J., Enk A.H.: Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 1285–1294
- [25] Jordan M.S., Boesteanu A., Reed A.J., Petrone A.L., Hohenbeck A.E., Lerman M.A., Najj A., Caton A.J.: Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.*, 2001; 2: 301–306
- [26] Levings M.K., Sangregorio R., Roncarolo M.G.: Human CD25⁺CD4⁺ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of suppressor function. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 1295–1302
- [27] Malek T.R., Yu A., Vincek V., Scibelli P., Kong L.: CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, 2002; 17: 167–178
- [28] McHugh R.S., Shevach E.M., Thornton A.M.: Control of organ-specific autoimmunity by immunoregulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. *Microbes Infect.*, 2001; 3: 919–927
- [29] Misra N., Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M.D., Kaveri S.V.: Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol.*, 2004; 172: 4676–4680
- [30] Nakamura K., Kitani A., Fuss I., Pedersen A., Harada N., Nawata H., Strober W.: TGF-β1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J. Immunol.*, 2004; 172: 834–842
- [31] Ng W.F., Duggan P.J., Ponchel F., Matarase G., Lombardi G., Edwards A.D., Isaacs J.D., Lechler R.I.: Human CD4⁺CD25⁺ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, 2001; 98: 2736–2744
- [32] Okazaki T., Iwai Y., Honjo T.: New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002; 14: 779–782
- [33] Read S., Malmstrom V., Powrie F.: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.*, 2000; 192: 295–302
- [34] Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M.: Immunologic self-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
- [35] Salomon B., Bluestone J.A.: Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001; 19: 225–232
- [36] Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A.: B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 2000; 12: 431–440
- [37] Schimpl A., Berberich I., Kneitz B., Kramer S., Santner-Nanan B., Wagner S., Wolf M., Hunig T.: IL-2 and autoimmune disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002; 13: 369–378
- [38] Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S.: Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 135–142
- [39] Stephens L.A., Mottet C., Mason D., Powrie F.: Human CD4⁺CD25⁺ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity *in vitro*. *Eur. J. Immunol.*, 2001; 31: 1247–1254
- [40] Suri-Payer E., Cantor H.: Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4⁺CD25⁺ T cells. *J. Autoimmun.*, 2001; 16: 115–123
- [41] 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
- [42] Taams L.S., Vukamanovic-Stejic M., Smith J., Dunne P.J., Fletcher J.M., Plunkett F.J., Ebeling S.B., Lombardi G., Rustin M.H., Bijlsma J.W., Lefeber F.P., Salmon M., Akbar A.N.: Antigen-specific T cell suppression by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2002; 32: 1621–1630
- [43] Taylor P.A., Noelle R.J., Blazar B.R.: CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 1311–1318
- [44] 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
- [45] Trzonkowski P., Szmit E., Mysliwska J., Dobyszyk A., Mysliwski A.: CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8⁺ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin. Immunol.*, 2004; 112: 258–267
- [46] Valzasina B., Guiducci C., Dislich H., Killeen N., Weiberg A.D., Colombo M.P.: Triggering of OX40 (CD134) on CD4⁺CD25⁺ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role of OX40 and its comparison with GITR. *Blood*, 2005; 105: 2845–2851
- [47] Walker L.S., Chodos A., Eggena M., Dooms H., Abbas A.K.: Antigen-dependent proliferation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2003; 198: 249–258
- [48] Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N., Levy-Lahad E., Mazzella M., Goulet O., Perroni L., Bricarelli F.D., Byrne G., McEuen M., Proll S., Appleby M., Brunkow M.E.: X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.*, 2001; 27: 18–20
- [49] 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: the role of IL-2, TGF-β, and IL-10. *J. Immunol.*, 2004; 172: 5213–5221
- [50] Zheng Y., Manzotti C.N., Liu M., Burke F., Mead K.I., Sansom D.M.: CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2004; 172: 2778–2784