

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra buněčné biologie



Bakalářská práce

Role regulačních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů při vzniku autoimunitních chorob

Iva Truxová

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.

Praha 2009

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Doc. MUDr. Kateřině Štechové, Ph.D. za cenné rady a trpělivost při vedení této práce.

## Obsah

Abstrakt.....	4
Seznam zkratk.....	5
1. Úvod- historie Tregs.....	7
2. Přirozeně se vyskytující (naturally occurring) Tregs- nTregs.....	8
2.1. Vznik a diferenciacce nTregs.....	8
2.2. Fenotyp nTregs.....	8
2.2.1. CD25.....	8
2.2.2. Foxp3.....	9
2.2.3. Další exprimované molekuly.....	10
2.3. Funkce a mechanismus působení nTregs.....	12
3. Polarizace imunitní odpovědi.....	13
4. Indukované Tregs- iTregs (adaptivní- aTregs).....	15
4.1. Indukce Tregs.....	15
4.2. Funkce a mechanismus působení iTregs.....	16
5. Role CD4+ Tregs při vzniku autoimunitních chorob.....	17
5.1. CD4+ Tregs v orgánově specifických autoimunitních chorobách: diabetes mellitus 1. typu a roztroušená skleróza.....	17
5.1.1. T1DM- diabetes mellitus 1. typu.....	17
5.1.2. MS (multiple sclerosis)- roztroušená skleróza.....	19
5.2. CD4+ Tregs v systémových autoimunitních chorobách: SLE- systémový lupus erythematoses.....	21
6. Terapeutické využití Tregs pro léčbu autoimunitních chorob.....	23
7. Závěr.....	26
Seznam použité literatury.....	27

## Abstrakt

Autoimunitní choroby vznikají jako důsledek selhání centrální (pozitivní selekce a klonální delece) a/nebo periferní tolerance. Navzdory tomu, že je klonální delece v thymu velice důležitá pro eliminaci autoreaktivních T buněk, periferní tkáně a orgány každého zdravého jedince obsahují potenciálně patogenní T buňky rozpoznávající vlastní antigeny. Přesto se u většiny lidí autoimunitní onemocnění nikdy nerozvine, což je zajištěno působením řady periferních imunoregulačních mechanismů zahrnujících indukci anergie T buněk, delecí T buněk a klonální ignoranci. Kromě těchto pasivních mechanismů, je dnes jasné, že existuje určitá populace T buněk, která je nejen schopna limitovat vznik patologií během normálních imunitních odpovědí, ale také aktivně suprimuje aktivaci a expanzi autoreaktivních T buněk (tedy suprimuje odpovědi na vlastní antigeny). Hlavní buněčnou populací, která udržuje periferní toleranci jsou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> n (naturally- occurring) Tregs, které vznikají v thymu. Na kontrole imunitních odpovědí se ale také podílejí další typy CD4<sup>+</sup> Tregs- i (indukované) Tregs vznikající po aktivaci naivních CD4<sup>+</sup> T buněk za určitých podmínek v periférii. Přibývající důkazy nasvědčují tomu, že hlavní roli v patogenezi autoimunitních chorob hraje nerovnováha v imunitním systému. Ta by mohla být způsobena narušenou imunoregulací vyplývající z přítomnosti sníženého počtu a/nebo funkčně defektních Tregs (což bylo dokumentováno v řadě těchto onemocnění). Výsledky studií na myších také přinášejí naději, že Tregs by v budoucnu mohly být využívány pro buněčnou terapii lidských autoimunitních onemocnění.

**Klíčová slova:** tolerance, autoimunitní onemocnění, suprese, nTregs, iTregs

Autoimmune diseases develop as a consequence of failure in central (positive selection and clonal deletion) and/or peripheral tolerance. Despite the fact that clonal deletion in the thymus is of central importance in eliminating autoreactive T cells, peripheral tissues and organs of each healthy individual contain potentially pathogenic T cells recognizing self antigens. Nevertheless autoimmunity occurs relatively rarely which is ensured by a variety of peripheral immunoregulatory mechanisms including induction of T-cell anergy, deletion of T-cells and clonal ignorance. Beside these passive mechanisms, it is now clear that a particular population of T cells (Tregs) is endowed by an ability to not only limit the development of

pathology during normal immune responses but also to actively suppress activation and expansion of autoreactive T cells (thus these cells suppress responses to self antigens). Thymus derived CD4+CD25+ nTregs (naturally-occurring Tregs) represent a major cell population that play a key role in maintenance of self-tolerance. Also other CD4+ Tregs exist and contribute to the control of immune responses- these cells develop in the periphery after activation of naive CD4+ T cells and are called induced Tregs (iTregs). Increased evidence now suggests that dysequilibrium in immune system plays a major role in the pathogenesis of autoimmune disease. This may be caused by failure in immunoregulation by Tregs which can have defects in number and/or function (a number of studies proved this defects in autoimmune patients). Hopeful results from murine models also suggest that Tregs can be used in future as cell therapies for treatment of autoimmune diseases.

Key words: self tolerance, autoimmune diseases, suppression, nTregs, iTregs

#### Seznam zkratek

AML1/Runx1	acute myeloid leukemia 1/runt-related transcription factor 1
CCR7	chemokinový receptor 7
CNS	centrální nervový systém
CTLA-4	cytotoxic T cell-associated antigen-4
DC	dendritické buňka (dendritic cell)
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
Foxp3	forkhead/winged-helix protein transcription factor
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GITR	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
GVHD	graft versus host disease
ICAM-1	mezibuněčná adhezivní molekula (intercellular adhesion molekule-1)
ICOS	indukovatelná kostimulační molekula (inducible costimulator)
IDO	indoleamine 2,3- dioxygenase
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
Ig	imunoglobulin

IL-2R	receptor pro interleukin 2 (IL-2)
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
iTregs	indukované (induced) regulační T buňky
LNs	lymfatické uzliny (lymph nodes)
MAdCAM 1	mukózní adhezivní molekula (mucosal addressin cell adhesion molecule 1)
MBP	myelin basic protein
MHC gp	major histocompatibility complex glykoproteiny
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein
MS	roztroušená skleróza (multiple sclerosis)
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NK	přirozený zabijec (natural killer)
NOD	non-obese diabetes mouse
nTregs	přirozeně se vyskytující regulační T buňky (naturally-occurring Tregs)
PD-1	programmed cell death-1 inhibitory receptor
SLE	systemový lupus erythematoses
T1DM	diabetes mellitus 1. typu
TCR	receptor T buněk pro antigen (T-cell receptor)
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
Th buňky	pomocné T buňky (helper T cells)
TNF- $\alpha$	faktor nekrotizující nádory $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
Tr1 buňky	regulační T buňky typu 1 (type 1 regulatory T cells)
VCAM 1	cévní adhezivní molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1)

## 1. Úvod- historie Tregs

Počátek historie Tregs je datován do roku 1970, kdy Gershon a Kondo poprvé pozorovali, že T buňky nejen podporují imunitní odpovědi, ale také jsou schopny je tlumit. Takovou schopnost měla subpopulace T buněk, které byly odlišné od pomocných Th (helper) buněk a byly nazvány supresorové T buňky (1). V následujících letech značně vzrostl zájem o jejich studium a postupně byly objevovány populace supresorových T buněk s různými fenotypy a mechanismy suprese. Navzdory velkému úsilí bylo toto téma na konci 80. let opuštěno v důsledku problémů spojených s identifikací spolehlivých markerů a tedy s odlišením supresorových T buněk od ostatní T buněčné populace. Zájem o ně znovu zesílil po roce 1995, kdy Sakaguchi a kolegové demonstrovali, že CD4<sup>+</sup> T buňky se silnými imunoregulačními funkcemi (in vitro i in vivo) exprimují CD25 (α řetězec receptoru pro IL-2), který by mohl sloužit jako marker CD4<sup>+</sup> Tregs. Tyto CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs (nazvané nTregs (naturally occurring- přirozeně se vyskytující)) hrají klíčovou roli při potlačování periferní autoreaktivity a přispívají k ustanovení tolerance v některých modelech autoimunitních onemocnění (2). Kromě nTregs, které vznikají v thymu, byly popsány další typy CD4<sup>+</sup> Tregs. Tyto buňky, které vznikají z naivních CD4<sup>+</sup> T buněk v periférii a teprve posléze přijímají regulační schopnosti, byly pojmenovány iTregs- indukované (adaptivní) Tregs a podílejí se na regulaci imunitních odpovědí. Přehled CD4<sup>+</sup> Tregs je uveden v tab. 1.

Tabulka 1: Typy CD4<sup>+</sup> Tregs (upraveno podle 3)

Typ CD4 <sup>+</sup> Tregs	fenotyp	předpokládaný mechanismus imunosuprese
nTregs vznikající v thymu	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	in vitro závislý na buněčném (cell-cell) kontaktu (CTLA-4); závislý na buněčném kontaktu a cytokinech in vivo (IL-10, TGF-β)
periferně indukované nTregs	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	in vitro závislý na buněčném (cell-cell) kontaktu (CTLA-4); závislý na buněčném kontaktu a cytokinech in vivo (IL-10, TGF-β)
Tr1 buňky	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+/-</sup> Foxp3 <sup>-</sup> IL-10 <sup>high</sup>	buněčný kontakt; produkce cytokinů (IL-10)
Th3 buňky	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+/-</sup> Foxp3 <sup>-</sup> TGF-β <sup>high</sup>	produkce cytokinů (TGF-β)

## 2. Přirozeně se vyskytující (naturally occurring) Tregs-nTregs

### 2.1. Vznik a diferenciaci nTregs

Přirozeně se vyskytující Tregs vznikají v thymu z Foxp3- thymocytů a představují samostatnou T buněčnou linii. Nesou na svém povrchu vysokoafinní TCRs (T-cell receptors) pro komplexy MHC glykoproteinů s vlastními (self) peptidy (4), které jsou prezentovány buňkami thymu (medulárními epiteliálními buňkami a dendritickými buňkami (DCs)). Diferenciaci nTregs zřejmě závisí na síle stimulace přes TCR (je potřeba silný signál (5)), intenzitě kostimulačních signálů (např. přes CD28) a cytokinovém prostředí (shrnutí v 6). Přirozeně se vyskytující Tregs opouštějí thymus jako funkčně zralé buňky (na rozdíl od většiny T buněk, které jsou naivní) a migrují do periferie (do lymfoidní (např. lymfatické uzliny- LNs) a nelymfoidní tkáně), kde jsou aktivovány (po setkání s antigenem v LNs při daleko nižší koncentraci antigenu, než je zapotřebí pro aktivaci naivních T buněk (7)) a posléze proliferují a vykonávají supresivní funkce. U myši představují CD4+CD25+ Tregs 5-10 % periferních CD4+ T buněk, zatímco lidské nTregs zaujímají jen 1-3 % CD4+ T buněk (8).

### 2.2. Fenotyp nTregs

#### 2.2.1. CD25

CD4+CD25+ nTregs konstitutivně exprimují  $\alpha$  řetězec receptoru pro IL-2 (CD25). U lidí jsou ale regulačními schopnostmi vybaveny asi jen 3 % těchto buněk s nejvyšší expresí CD25 (CD25<sup>high</sup>). Populace se střední expresí CD25 představuje variabilní směs regulačních a aktivovaných efektorových buněk (8). Úroveň CD25 je regulována IL-2. Myši neprodukující IL-2 mají značně redukovaný počet CD4+CD25+ T buněk (9). Alfa řetězec receptoru pro IL-2 je součástí vysokoafinního receptoru pro IL-2 (IL-2R). Je to heterotrimerický komplex složený z  $\alpha$  řetězce (CD25),  $\beta$  řetězce (CD122) a společného  $\gamma$  řetězce (CD132). Navázání IL-2 na receptor na aktivovaných T buňkách iniciuje komplexní signalizační program, který indukuje proliferaci (je kritický pro progresi buněčného cyklu), zvýšené přežívání, popřípadě buněčnou smrt (10). Navzdory potřebě IL-2 pro rozvoj CD4+CD25+ Tregs a jejich přežívání v periférii in vivo a navzdory expresi všech 3 podjednotek vysokoafinního IL-2R, zůstávají



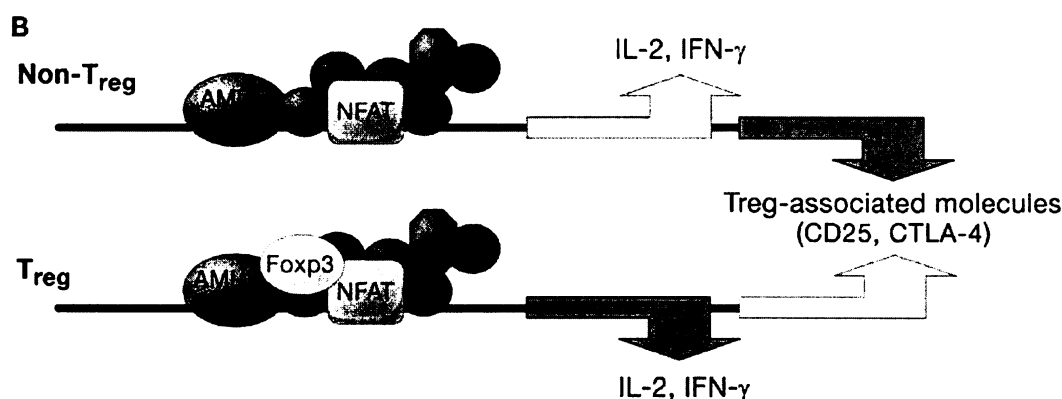
CD4+CD25+ T buňky hypoproliferativní po stimulaci IL-2 in vitro. To svědčí o odlišné signalizaci ve srovnání s aktivovanými T buňkami, která je klíčová pro vznik anergického fenotypu Tregs jako odpověď na IL-2. Zároveň IL-2 zvyšuje přežívání Tregs, což je spojeno se stimulací exprese antiapoptotické molekuly bcl-x<sub>L</sub> (11). CD25 ale není zcela specifickým markerem CD4+CD25+Tregs, protože je exprimován i aktivovanými neregulačními CD4+ T buňkami.

### 2.2.2. Foxp3- transkripční faktor forkhead box p3 (forkhead/winged-helix protein transcription factor)

CD4+CD25+ Tregs konstitutivně exprimují Foxp3, který je hlavním regulátorem jejich vývoje a funkcí. Gen Foxp3 byl poprvé identifikován v myších kmenu Scurfy, kde jeho mutace vedla k hyperaktivaci CD4+ T buněk a k nadprodukcí prozánětlivých cytokinů (12). Mutace v lidském genu Foxp3 vede ke vzniku těžké autoimunitní choroby IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) (13). Důležitost Foxp3 byla potvrzena studiemi, které ukázaly, že jeho ektopická exprese v T buňkách vede k tvorbě regulačních buněk se supresivními funkcemi. Retrovirová transdukce Foxp3 genu totiž může změnit CD4+CD25- T buňky na CD4+CD25+ Treg-like buňky, které jsou schopné suprimovat proliferaci ostatních T buněk in vitro a inhibovat vznik autoimunitních chorob a zánětlivých střevních onemocnění in vivo (14).

Foxp3 funguje jako transkripční aktivátor i represor- záleží na cíli jeho působení. Stimuluje expresi CD25 a dalších povrchových molekul asociovaných s Tregs, jako CTLA-4 (cytotoxic T cell-associated antigen-4) a GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) a zároveň je schopen reprimovat produkci IL-2, IFN- $\gamma$  a IL-4 (15). Analýza funkcí Foxp3 ukázala, že je schopný se přímo navázat na geny pro IL-2 a další cytokiny (IFN- $\gamma$ , IL-4) v T buňkách, ale pouze během jejich stimulace. Vazba na gen pro IL-2 může proběhnout pouze po interakci Foxp3 s transkripčním faktorem NFAT (nuclear factor of activated T-cells) (16). Zdá se, že důležitá je také interakce s transkripčním faktorem AML1/Runx1 (acute myeloid leukemia 1/runt-related transcription factor 1) (17). Foxp3 tak blokuje schopnost NFAT a AML1/Runx1 stimulovat expresi genů pro IL-2, IL-4 a IFN- $\gamma$ . Vzhledem k tomu, že jsou tyto transkripční faktory spojené s aktivací neregulačních buněk a jejich diferenciací na efektorové buňky, výsledným působením Foxp3 je funkční konverze buňky na Tregs. I když

je Foxp3 primárně exprimován v nTregs, může být jeho exprese také indukována v CD4+ a CD8+ T buňkách během jejich aktivace (18), což může být přirozeným mechanismem periferní indukce regulačních buněk.



Obr.1: Schéma kontroly funkcí Tregs expresí Foxp3. Transkripční komplexy zahrnující NFAT a AML1/Runx1 aktivují nebo reprimují geny kódující cytokiny a některé povrchové molekuly v Tregs a neregulačních buňkách (non-Tregs) v závislosti na přítomnosti Foxp3. Převzato z 19.

### 2.2.3. Další exprimované molekuly

Lidské nTregs izolované z periferní krve konstitutivně exprimují vysoké hladiny CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), MHC gp II (major histocompatibility complex glykoproteiny II. třídy) DR , CD45RO, PD-1 (programmed cell death-1 inhibitory receptor) a indukovatelnou kostimulační molekulu ICOS (inducible costimulator) (20). Ovšem ani jeden z těchto markerů pro ně není skutečně specifický, protože mohou být v různé míře exprimovány na aktivovaných T buňkách. Zdá se, že negativní regulační molekuly GITR a CTLA-4 by mohly hrát roli v supresivních funkcích Tregs. Např. zvýšená exprese CTLA-4 brání in vitro i in vivo aktivaci T buněk kompeticí s kostimulační molekulou CD28 o navázání na CD80/CD86 (21). Foxp3+ Tregs také exprimují spektrum homing receptorů zahrnujících adhezivní molekuly a chemokinové receptory, které mohou být funkčně významné (umožňují Tregs migrovat do lymfoidních tkání (např. LNs), popřípadě i do nelymfoidních tkání, kde suprimují nežádoucí imunitní odpovědi). V periferních lymfatických uzlinách 80 % Foxp3+ Tregs exprimuje ve vysokých množstvích CCR7 (chemokine receptor 7). Frakce (~ 30 %) Foxp3+ Tregs exprimuje CD103 (integrin  $\alpha$ E $\beta$ 7), který interaguje s E-kadherinem produkovaným střevními

epiteliálními buňkami (exprese CD103 je spojena s migrací Tregs do míst zánětu) a ~ 50 % z nich má vysokou expresi L-selektinu (CD62L), který interaguje s vaskulárními adresiny na povrchu endoteliálních buněk v LN a slizniční lymfoidní tkáni (22). Bylo také prokázáno, že exprese receptoru pro IL-7 (CD127) nepřímo koreluje s úrovní exprese Foxp3 a tedy se supresivními schopnostmi lidských Tregs a nabízí možnost separace skutečně supresivních CD25+CD127<sup>low</sup> Tregs od aktivovaných neregulačních CD25+CD127<sup>high</sup> buněk (23). Dále byl intenzivně studován cytokinový profil nTregs, který se liší od profilu některých typů indukovaných Tregs. Lidské nTregs nesekretují detekovatelná množství IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  ani IL-10, ale mohou produkovat TGF- $\beta$ , i když v množství, které není výrazně odlišné od neregulačních buněk (24). Přehled nejvýznamnějších molekul umožňujících charakterizaci nTregs je uveden v tab. 2.

Tabulka 2: Markery nTregs (informace z 18, 19, 22, 23, 47)

Molekula	Název molekuly	Charakteristika/Funkce
CD25 (IL-2R $\alpha$ )	$\alpha$ řetězec receptoru pro IL-2	esenciální pro rozvoj Tregs
Foxp3	transkripční faktor forkhead box p3 (forkhead/winged-helix protein trans. factor)	hlavní regulátor vývoje a funkcí Tregs
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4	možná role v kontaktně dependentní supresi
GITR	glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor	možná role v kontaktně dependentní supresi
CD45RO		především znak aktivovaného/paměťového fenotypu většiny Tregs
CD62L	L-selektin	umožňuje Tregs migrovat do LN (popřípadě do slizniční lymf. tkáně)
CD103	integrin $\alpha E\beta 7$	primárně spojen s migrací T buněk do střevní tkáně; homing Tregs do míst zánětu
CCR7	chemokinový receptor 7	migrace Tregs do sekundárních lymf. tkání (LN)
CD127 <sup>low/-</sup>	receptor pro interleukin 7	nízká exprese umožňuje odlišit Tregs od aktivovaných nereg. buněk
PD-1	programmed cell death-1	negativní regulátor- indukce buněčné smrti; role ve funkcích Tregs ?

### 2.3. Funkce a mechanismus působení nTregs

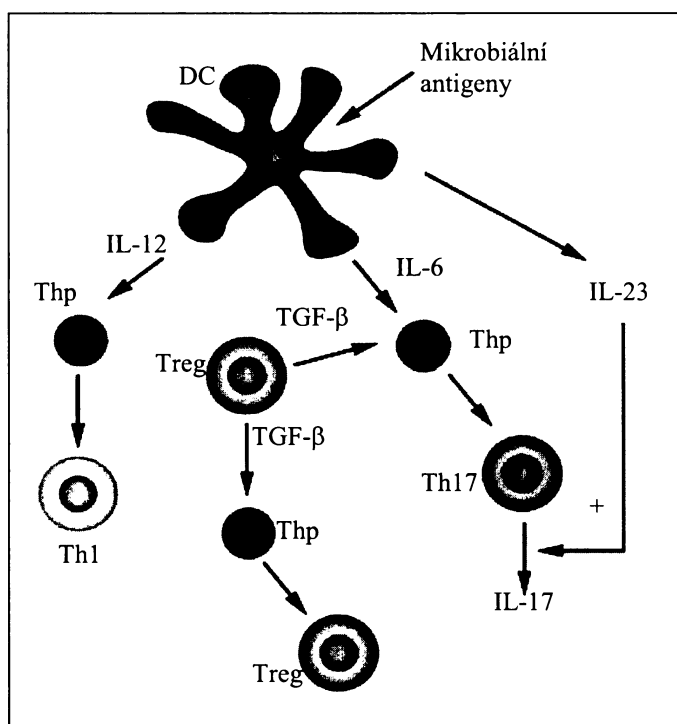
Myši i lidské CD4+CD25+ nTregs exprimují rozmanitý repertoár TCRs podobně jako CD4+CD25- T buňky, což svědčí o jejich schopnosti rozeznávat široké spektrum antigenů. Ačkoli nejsou omezeny pouze na vlastní antigeny, velké množství nTregs je v periférii rozeznává s daleko větší účinností než CD4+CD25- buňky (25). Společně se zjištěním, že nTregs mohou také rozeznávat epitopy přímo na TCRs, to podporuje zásadní roli CD4+CD25+ Tregs v regulaci tolerance k vlastním antigenům (26). Foxp3+CD4+CD25+ nTregs suprimují proliferaci naivních T buněk a jejich diferenciaci na efektorové T buňky in vivo. Mohou také suprimovat efektorové aktivity diferencovaných CD4+ a CD8+ T buněk a funkci NK (natural killer) buněk, NK T buněk, B buněk, makrofágů, osteoklastů a DCs (shrnutí v 19). I když některé důkazy svědčí o tom, že Th2 buňky mohou být k supresi méně citlivé, než Th1 buňky (27), lidské CD4+CD25+ Tregs účinně inhibují produkci IL-2, IFN- $\gamma$  a IL-13 CD4+ T buňkami (8). Princip mechanismů, kterými CD4+CD25+ nTregs inhibují imunitní odpovědi, není jasný a zůstává kontroverzní vzhledem k rozdílným výsledkům in vitro a in vivo. Zdá se, že in vitro lidské i myši CD4+CD25+ nTregs suprimují T buňky způsobem závislým na buněčném kontaktu a nezávislým na produkci cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  (7). Přesto nejsou molekuly zprostředkující tuto kontaktně-dependentní supresi do velké míry známy. Pravděpodobnými kandidáty by mohly být molekuly GITR a CTLA-4 exprimované na povrchu CD4+CD25+ Tregs (28). CTLA-4 způsobí ligaci CD80/CD86 na povrchu efektorové buňky, čímž dojde k přenosu negativního (supresivního) signálu a k následné inhibici funkcí efektorové T buňky (29). Narušení aktivace efektorové T buňky může být také indukováno ovlivněním funkcí DCs. Ligace CD80/CD86 na povrchu DC molekulou CTLA-4 vede k expresi a aktivaci enzymuIDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), který se účastní degradace tryptofanu. Redukce koncentrace tryptofanu v médiu je spojena se sníženou aktivací a delecí T buněk (30,31). Tregs mohou dále inhibovat maturaci DCs a jejich schopnost prezentovat antigen efektorovým T buňkám (32) a také mohou během časných fází imunitní odpovědi in vivo narušit stabilní kontakty mezi antigen-specifickými CD4+ T buňkami a DCs, čímž zabrání prezentaci antigenu efektorovým T buňkám. Navíc CD4+CD25+ Tregs mohou být indukovány, aby exprimovaly granzym A a zabily aktivované CD4+ a CD8+ T buňky mechanismem závislým na perforinu. Účast Fas/FasL nebyla v tomto procesu prokázána (33). Zda cytokiny odvozené od nTregs přispívají k mechanismům, kterými tyto buňky regulují imunitní odpovědi in vivo, není jasné a zůstává kontroverzní.

Jejich účast totiž může být ovlivňována řadou fyziologických faktorů- např. vlastnostmi cílového orgánu a povahou a silou zánětu. I přesto mnoho dat in vivo nasvědčuje tomu, že TGF- $\beta$  a IL-10 hrají roli v supresi zprostředkované CD4+CD25+ nTregs (34). Ovšem tato zjištění mohou být dána indukcí nových typů regulačních buněk. Je totiž možné, že mohou navodit produkci TGF- $\beta$  okolními buňkami, což následně způsobí diferenciaci CD4+CD25- T buněk na CD4+Foxp3+ T buňky, které sekretují IL-10 (35). Navíc 2 typy lidských CD4+CD25+ Tregs mají schopnost indukovat de novo diferenciaci Tr1 buněk produkujících IL-10 a jsou schopny navodit vznik Th3 buněk, které vytvářejí TGF- $\beta$ -dále uvedeno v kapitole 4.1. Pro objasnění molekulární podstaty suprese zprostředkované nTregs jsou zapotřebí další studie. Také není jasné, zda suprimované buňky zůstanou po působení Tregs neaktivní, přejdou do apoptosy nebo se stanou anergickými.

### 3. Polarizace imunitní odpovědi

Naivní CD4+ T buňky mohou být během stimulace antigenem v periférii indukovány, aby se diferencovaly na Th1, Th2, Th17 buňky nebo Tregs. Vzhledem k tomu, že Tregs mají protizánětlivou roli a udržují toleranci k vlastním antigenům (a tedy zabraňují vzniku autoimunitních chorob) a efektorové Th buňky vykonávají funkce aktivující imunitní odpovědi (produkce prozánětlivých cytokinů), může dysregulovaná expanze efektorových Th buněk (především Th1 a Th17 buněk) vést ke vzniku nebo rozvoji řady zánětlivých nebo autoimunitních chorob. Bylo také pozorováno, že mnoho z těchto onemocnění má periody, ve kterých dochází k zánětlivému vzplanutí a klidná období mezi nimi. Období bez zánětu svědčí o "rovnováze", během které se ustanoví tolerance ke komponentám vlastního těla (a tedy protizánětlivé komponenty jsou regulovány). V průběhu akutních zánětlivých period jsou naopak imunitní odpovědi na vlastní antigeny dysregulovány, což může být vysvětleno přednostním vznikem prozánětlivých buněčných linií (Th1 a Th17) nebo jejich zvýšeným přežíváním na základě lokálního cytokinového prostředí a přítomnosti určitých populací DCs (shrnuto v 36). Tvorba jednotlivých linií T buněk totiž závisí na způsobu stimulace, koncentraci antigenu, kostimulačních signálech a cytokinovém prostředí (37). Zatímco IL-12 produkovaný DCs, které byly stimulovány mikrobiálními antigeny specifikuje vznik Th1 buněk a má stimulační efekt na sekreci IFN- $\gamma$  těmito buňkami (38), Th17 buňky se mohou

z naivních CD4<sup>+</sup> T buněk tvořit v přítomnosti DCs a Tregs v zánětlivém prostředí (stimulace lipopolysacharidem). Absence Tregs vede k diferenciaci na Th1 buňky, především interakcemi naivních T buněk s DCs produkujícími IL-12. V přítomnosti DCs i Tregs jsou hlavními faktory řídícími vznik Th17 buněk TGF- $\beta$  odvozený od Tregs a IL-6 odvozený od DCs (39). Navíc IL-23 produkovaný aktivovanými lidskými makrofágy a DCs je důležitý pro jejich selektivní expanzi a pro sekreci pro ně charakteristického prozánětlivého cytokinu IL-17 (38). Vzhledem k tomu, že TGF- $\beta$  je také důležitým faktorem pro vznik Foxp3<sup>+</sup> Tregs, existuje mezi nimi a Th17 buňkami vzájemný vztah, ve kterém přítomnost či nepřítomnost IL-6 rozhoduje o ovládnutí imunitní odpovědi Th17, resp. Foxp3<sup>+</sup> Tregs (40).



Obr.2: Myší model diferenciacie pomocných T buněk (Th) na Th1, Th17 a Tregs po setkání s antigenem. Produkce TGF- $\beta$  nTregs podporuje vznik Tregs z prekurzorů Th buněk (Thp). Stimulace DC mikrobiálními antigeny způsobí produkci IL-6, IL-23 a/nebo IL-12. Převládající sekrece IL-12 indukuje tvorbu Th1 buněk z Thp, zatímco IL-6 v kombinaci s TGF- $\beta$  odvozeným od Tregs vede k diferenciaci Thp na Th17 buňky. IL-23 produkovaný DC způsobí proliferaci a sekreci cytokinů těmito buňkami. Převzato z 36.

## 4. Indukované Tregs- iTregs (adaptivní- aTregs)

### 4.1. Indukce Tregs

Zdá se, že vznik regulačních buněk závisí na množství přítomného antigenu a síle interakce (nízké dávky antigenu/slabá stimulace vede k tvorbě více Tregs) a na způsobu antigenní stimulace (pro konverzi naivních T buněk na Tregs je důležitá prezentace antigenu nezralými nebo suboptimálně aktivovanými DCs) (41). Pro vznik Foxp3<sup>+</sup> Tregs je také podstatná přítomnost TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  se účastní přeměny naivních CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T buněk na CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs-like buňky jak in vivo, tak in vitro a to tím, že v nich indukuje expresi Foxp3 (42). Dále i IL-2 umožňuje diferenciaci naivních CD4<sup>+</sup> T buněk na Foxp3<sup>+</sup> Tregs a navíc inhibuje jejich diferenciaci na Th17 buňky. Tvorba Th17 buněk řízená IL-6 je inhibována i kyselinou retinovou, kterou sekretuje speciální typ DCs ve střevní lymfoidní tkáni (GALT-gut-associated lymphoid tissue). V přítomnosti TGF- $\beta$  kyselina retinová umožňuje vznik Foxp3<sup>+</sup> Tregs z naivních T buněk. Proto orálně podané antigeny prezentované DCs, které produkují retinovou kyselinu, mohou indukovat Foxp3<sup>+</sup> Tregs. To může představovat mechanismus orální tolerance (43). Není ovšem jasné, zda indukované Foxp3<sup>+</sup> Tregs jsou funkčně stabilní in vivo a jak moc přispívají k celkovému počtu Foxp3<sup>+</sup> Tregs v periférii. Existují další typy Tregs kromě Foxp3<sup>+</sup> Tregs, které mohou být indukovány z naivních T buněk v periférii, např. CD4<sup>+</sup> T lymfocyty sekretující IL-10 a TGF- $\beta$  nazvané Tr1 buňky. Tr1 buňky byly poprvé definovány v in vitro studiích zahrnujících priming CD4<sup>+</sup> T buněk v přítomnosti IL-10. Vznik Tr1 buněk je stimulován nezralými DCs mechanismem závislým na IL-10 a také DCs, které byly aktivovány v přítomnosti řady tolerogenních stimulů (např. IL-10, vitamin D3, cholera toxin). Zdá se, že diferenciaci Tr1 buněk má 2 stadia. Nejdříve se po antigenně specifické nebo polyklonální aktivaci stanou anergickými a nejsou schopny proliferace a produkce cytokinů. V tomto stadiu jsou sice schopné suprimovat naivní T buňky, ale závisle na buněčném kontaktu a ne na produkci cytokinů. Druhé stadium diferenciaci probíhá po nucené proliferaci in vitro a také pravděpodobně po opakovaném vystavení antigenu in vivo. Buňky, které byly předtím anergické, znovu částečně získají schopnost proliferace a sekrece cytokinů. Mají unikátní profil produkovaných cytokinů ( IL-2<sup>-</sup>/<sup>low</sup>, IL-4<sup>-</sup>, IL-5<sup>+</sup>, IL-10<sup>+</sup>, TGF- $\beta$ <sup>+</sup>), který je jiný, než cytokinové profily Th0, Th1 a Th2 buněk (shrnuto v 44). K tvorbě Tr1 buněk, ale i dalšího typu iTregs- Th3 buněk přispívají také CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs a to mechanismem nazvaným infekční tolerance. Lidské CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Tregs exprimující integrin  $\alpha 4\beta 7$  (váže se na mukózní adhezivní molekulu MAdCAM 1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1), která je exprimována endotelem v mukózních tkáních) mají totiž schopnost navodit de novo diferenciaci Tr1 buněk. Jiný typ  $CD4+CD25+$  Tregs exprimující  $\alpha 4\beta 1$  integrin (váže se na cévní adhezivní molekulu VCAM 1 (vascular cell adhesion molecule) na povrchu endoteliálních buněk zánětlivých tkání) má pak schopnost indukovat vznik Th3 buněk, které produkují TGF- $\beta$  (45). In vivo byly Th3 buňky indukovány po orálním nebo intravenózním podání antigenu (46).

#### 4.2. Funkce a mechanismus působení

Indukované Tregs vykonávají své funkce primárně produkcí cytokinů (TGF- $\beta$  a IL-10). Výjimkou by mohly být  $CD4+CD25+$  nTregs-like buňky, jejichž funkce in vitro jsou, podobně jako funkce nTregs, závislé na buněčném kontaktu (47). Avšak zdá se, že jsou schopny indukovat diferenciaci Tr1 buněk (48), které vykazují supresi dependentní na IL-10. Tr1 buňky regulují naivní a paměťové T buňky in vitro i in vivo a mohou suprimovat jak Th1, tak Th2 odpovědi (podobně jako Th3 buňky) (49). Kromě T buněk působí na další buněčné typy. Například supernatant z aktivovaných Tr1 buněk silně redukuje schopnost DCs indukovat antigenně specifickou proliferaci T buněk (50), protože IL-10 inhibuje expresi MHC II a kostimulačních molekul na DCs (51). Tr1-buněčné klony také inhibují produkci protilátek B buňkami. Dále je pravděpodobné, že jsou schopny lokální sekrecí IL-10 navodit vznik dalších Tr1 buněk z naivních  $CD4+$  T buněk. Důkazy ze studií na myších i lidských buňkách ukazují, že hlavní funkcí Tr1 buněk je kontrolovat odpovědi na cizí antigeny v periférii. I když mohou také rozeznávat vlastní antigeny (52), většina studií potvrzuje, že Tr1 buňky především regulují odpovědi na alergeny, patogeny a alloantigeny a to produkcí IL-10. Zdá se, že tyto buňky jsou velmi důležité v mukózních tkáních, kde dochází primárně k jejich střetu s cizími antigeny. Vzhledem k tomu, že Th3 buňky sekretují velké množství TGF- $\beta$ , který podobně jako IL-10 snižuje expresi MHC gp II. třídy a kostimulačních molekul na DCs (53), tyto buňky redukují schopnost DCs stimulovat T buňky. Produkce TGF- $\beta$  také může podpořit vznik dalších regulačních buněk (indukcí Foxp3).



## 5. Role CD4+ Tregs při vzniku autoimunitních chorob

### 5.1. CD4+ Tregs v orgánově specifických autoimunitních chorobách- diabetes mellitus 1. typu a roztroušená skleróza

#### 5.1.1. T1DM- diabetes mellitus 1. typu

Diabetes 1. typu vzniká jako důsledek narušené tolerance k antigenům pankreatických ostrůvků. To vede k nekontrolované T buňkami zprostředkované autoimunitní destrukci pankreatických  $\beta$  buněk produkujících insulin. Autoreaktivní populace CD4+ T lymfocytů rozpoznává vlastní antigeny a po aktivaci přednostně produkuje spektrum cytokinů typických pro Th1 buňky (především IFN- $\gamma$ ), které iniciují autoimunitní proces. Pro další rozvoj onemocnění je nutná přítomnost autoreaktivních CD8+ cytotoxických T lymfocytů (54). Současné studie ukazují na výskyt defektní regulace T buněk v pacientech s diabetem 1. typu. Shelley Lindley a kolegové prokázali, že vznik tohoto onemocnění je doprovázeno defektní regulací imunitních odpovědí CD4+CD25+ T buňkami. Zjistili totiž, že regulační schopnosti CD4+CD25+ T buněk izolovaných z pacientů trpících diabetem 1. typu jsou značně redukovány ve srovnání s CD4+CD25+ Tregs kontrolních subjektů a to, co se týká suprese proliferace i regulace sekrece prozánětlivého cytokinu IFN- $\gamma$ . Navíc tyto CD4+CD25+ T buňky nebyly schopny navodit produkci protizánětlivých cytokinů na rozdíl od buněk izolovaných z kontrolních subjektů, které sekretovaly protizánětlivý IL-10 ve vysokých koncentracích (55). Další studie také potvrdily, že pacienti s diabetem mají CD4+CD25+ T buňky s defektními funkcemi na rozdíl od zdravých kontrol (56). Ovšem Amy L. Putnam a kolegové nepozorovali žádné signifikantní rozdíly mezi supresivními schopnostmi CD4+CD25+ T buněk těchto 2 skupin (57). Tyto odlišnosti mohou být dány použitím odlišných stimulačních podmínek. Dále bylo zjišťováno, zda osoby trpící diabetem nemají snížený počet cirkulujících CD4+CD25+ T buněk. Výsledky nejsou příliš jednotné- zatímco v některých studiích nebyly zaznamenány výrazné změny ve frekvenci těchto buněk mezi pacienty s diabetem a kontrolními osobami (55,56,57), v jiných studiích byl snížený počet CD4+CD25+ T buněk v pacientech pozorován. Hlavní pokrok v pochopení diabetu 1. typu přineslo použití myšího modelu této nemoci ( NOD –non-obese diabetes mouse model). V NOD myších je pro patogenezi diabetu nutný priming diabetogenních T buněk v pankreatických LNs během časně fáze onemocnění, kdy dochází k jejich expanzi,

diferenciaci a iniciaci exprese adhezivních molekul a chemokinových receptorů. To těmto autoreaktivním buňkám umožní opustit LNs a zahájit invazi cílové tkáně (58). Pro infiltraci ostrůvků je důležitá interakce  $\alpha 4\beta 7$  integrinu s MAdCAM1 (59). V cílových tkáních jsou T buňky reaktivovány a uplatní efektorové funkce vedoucí k poškození tkáně. Infiltráty leukocytů jsou v NOD myším modelu pozorovatelné brzy po iniciaci primingu. Přesto trvá 10-30 týdnů, než zánět přejde v destruktivní insulitidu vedoucí ke ztrátě produkce insulinu a ke vzniku diabetu. Jedním z mnoha možných vysvětlení může být, že přechod mezi těmito 2 stadii je pod kontrolou Tregs. Tang a Bluestone testovali, zda přechod z nedestruktivní insulitidy do destruktivní formy a prediabetu je důsledkem redukce počtu Tregs nebo ztráty jejich funkce. Srovnali množství Foxp3+ buněk v LNs pankreatu a pankreatických ostrůvcích 6 týdnů starých prediabetických myší a myší, které již diabetes rozvinuly. Překvapivě byl počátek diabetu doprovázen zvýšením počtu Tregs v pankreatických LNs, což korelovalo s redukcí proliferací Foxp3- buněk. Myši s diabetem měly také v insulitických lézích zvýšený počet Tregs oproti prediabetickým myším, i když relativní množství Tregs se snížilo v důsledku velké expanze Foxp3- populace. To nasvědčuje průběžnému hromadění Treg-rezistentních buněk, což vede k destrukci ostrůvků a vzniku diabetu (60). Jiné studie ovšem přisuzují vznik diabetu v NOD myších defektu v CD4+CD25+ Tregs nebo byly pozorovány redukcované frekvence CD4+CD25+CD62<sup>high</sup> Tregs exprimujících Foxp3 a TGF- $\beta 1$  v pankreatických LNs a ostrůvcích NOD myších samic při přechodu z benigní do agresivní insulitidy (shrnutí v 61). Společným zjištěním většiny studií ovšem je, že supresorové schopnosti těchto buněk klesají s progresí autoimunity proti  $\beta$  buňkám pankreasu. Také se zdá, že Tregs brání progresi diabetu inhibicí primingu efektorových T buněk a jejich funkcí. Úspěšný priming v LNs vede ke klonální expanzi T buněk, jejich diferenciaci, přijetí efektorových funkcí a k invazi cílových tkání. Bylo prokázáno, že všechny tyto procesy jsou Tregs kontrolovány. Několik laboratoří demonstrovalo, že CD62L+ Tregs (mají schopnost homingu do LNs) vykazují vyšší supresivní aktivitu in vivo při obraně proti diabetu 1. typu a GVHD (graft versus host disease), protože jsou více efektivní v suprimování primingu v LNs. Navíc se zdá, že antigen-specifické Tregs jsou v inhibici proliferace efektorových T buněk efektivnější než polyklonální Tregs (60). Efekt Tregs na tkáňovou invazi Th buněk není moc dobře znám. Jedna současná studie demonstrovala, že Tregs inhibují expresi chemokinového receptoru CXCR3 na Th buňkách jako důsledek suprimované diferenciace na IFN- $\gamma$  produkující buňky (62). Redukovaná exprese CXCR3 koreluje s nízkou infiltrací

pankreatických ostrůvků a protekcí proti diabetu (60). Přítomnost Tregs v zánětlivé tkáni, zahrnující i ostrůvky pankreatu, napovídá, že by Tregs mohly potenciálně fungovat i v místě zánětu. V místech zánětu může ovšem prozánětlivé cytokinové prostředí napomoci efektorovým T buňkám odolávat kontrole Tregs (63).

### 5.1.2. MS (multiple sclerosis)- roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza je komplexní genetické onemocnění spojené s chronickým zánětem v centrálním nervovém systému (CNS), demyelinizací, úbytkem axonů a mozkovou atrofií, jehož patogeneze se pravděpodobně účastní aktivované autoreaktivní T buňky (především Th1 a Th17 typu) rozpoznávající myelinové antigeny (64). Dlouhou dobu se pozornost zaměřovala na možnost, že osoby s MS by mohly mít nižší úroveň funkčních regulačních buněk a patogenní neuroantigen-reaktivní T buňky by tak mohly unikat regulaci. Viglietta a kolegové ale nedetekovali žádné rozdíly v počtu těchto buněk cirkulujících v krvi mezi pacienty s MS (revadující- relapsing-remitting (RR) forma MS) a kontrolami. Ovšem naproti tomu zjistili, že Tregs izolované z pacientů s MS mají redukovanou schopnost suprese ve srovnání s kontrolními subjekty (Tregs zdravých osob inhibovaly jak proliferaci, tak sekreci IFN- $\gamma$  efektorovými T buňkami). Dále také zjistili, že ztráta funkcí Tregs v pacientech s MS není dána zvýšenou rezistencí aktivovaných efektorových T buněk, ale sídlí v Tregs. Tato defektní buněčná populace byla charakterizována jako CD62L<sup>+</sup> (65). Kromě ní byly objeveny funkční abnormality i v jiném typu Tregs- v Tr1 buňkách indukovaných CD46. Signalizace přes tuto kostimulační molekulu vede ke vzniku Tr1 fenotypu a k sekreci protizánětlivého cytokinu IL-10. Osoby s MS nejsou schopny po kostimulaci CD46 sekretovat IL-10 (66). Další studie také potvrdily sníženou funkčnost CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs v pacientech s MS, která primárně sídlí v Tregs samotných (67, 68). Huan a kolegové demonstrovali, že snížená suprese CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs MS pacientů koreluje se sníženou expresí Foxp3 (67) a Venken a kolegové, že úroveň Foxp3 a tedy funkce Tregs závisí na stadiu nemoci spíše než na věku pacientů (68). Zjištění, že Tregs v krvi RR MS pacientů mají zvýšenou expresi integrinu  $\alpha 4\beta 1$  a CD103 (molekuly spojené s homingem do zanícených tkání) a frekvence Tregs v mozkomíšním moku těchto osob byla vyšší než v jejich krvi, indikují, že Tregs mohou migrovat z krve do místa zánětu (a pravděpodobně je to spojeno se zánětlivým stadiem nemoci) (69).

Myším modelem MS je EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis). Výsledky z myších modelů silně napovídají, že Tregs dokáží předejít spontánní a indukované EAE (příspívají k uzdravení a genetické rezistenci vůči EAE). CD4+CD25+ Tregs mohou vykonávat své aktivity v LNs a potenciálně i přímo v CNS. Tregs odvozené od LNs inhibují antigeně-indukovanou (indukovanou MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein)) proliferaci a sekreci IFN- $\gamma$  encefalitogenními MOG-specifickými T buňkami in vitro a in vivo redukuje zánět v CNS (a tedy klinické a histologické příznaky EAE). Tyto Tregs migrující in vivo do LNs selektivně exprimují P-selektin (CD62P) a mezibuněčnou adhezivní molekulu ICAM-1 (intercellular adhesion molekule-1) (jsou pravděpodobně schopny navodit interakce s cílovými T buňkami) a zřejmě inhibují expanzi encefalitogenních T buněk indukci lokální produkce cytokinů Th2 typu (shrnuto v 70). Tregs vyskytující se v CNS mohou být od lymfatických Tregs odlišeny expresí chemokinového receptoru CCR5 a CD103- markerů, které jsou asociovány s homingem Tregs do míst zánětu. I když je toho velmi málo známo o mechanismech, jakými Tregs suprimují EAE in vivo, současná data ukazují, že během časných fází EAE dochází v LNs k antigeně-specifické aktivaci Tregs (71) a k jejich akumulaci v CNS dochází až během pozdějších fází, kdy zánět CNS ustupuje (72). I přes nutnost aktivace Tregs odpovídajícím antigenem (např. MBP (myelin basic protein) v případě EAE způsobené MBP- specifickými efektorovými T buňkami nebo MOG v případě EAE indukované MOG-specifickými T buňkami) se zdá, že suprese Tregs není antigeně specifická, resp., že Tregs jsou schopny suprimovat efektorové T buňky i jiných specifit. Např. hlavní regulační populace, která inhibuje MBP-specifické T buňky, obsahuje Tregs specifické pro jiné antigeny než MBP (73). Tregs izolované z CNS (ale ne z LNs) jsou hlavním zdrojem IL-10 v EAE (72). Počet těchto CD4+CD25+ T buněk se v průběhu EAE zvyšuje a dobře koreluje s ústupem nemoci, což nasvědčuje tomu, že tyto buňky by mohly hrát hlavní roli v uzdravovacím procesu. Vzhledem k tomu, že i astrocyty sekretují IL-10, je možné předpokládat, že jsou schopny navodit vznik Tr1 buněk (sekretujících IL-10), které by mohly přispět k supresi zánětu v CNS (49). Potenciální roli v ústupu nemoci by mohl mít i TGF- $\beta$  odvozený od Tregs, ale pro potvrzení je potřeba ověřit, zda jeho hlavními zdroji nejsou jiné buňky. Stejně tak musí být definovány lokální cíle této suprese (CD4+, CD8+ T buňky, B buňky, DCs nebo makrofágy). I když bylo dokázáno, že se Tregs akumulují v mozku během ústupu EAE (72), není stále jasné, zda jejich imunosupresivní schopnosti umožňují narušit již probíhající EAE. Analýza funkcí myších Foxp3+ Tregs z CNS ukázala, že tyto buňky nebyly

schopny suprimovat aktivaci MOG-specifických T buněk z CNS, což indikuje, že jsou tyto encefalitogenní buňky rezistentní k regulaci. Zdá se, že odolné k supresi jsou pouze efektorové T buňky odvozené z CNS a ne lymfatické T buňky. Navíc efektorové T buňky z CNS jsou rezistentní k supresi, pokud byly izolovány v počátečním nebo vrcholném stadiu nemoci, zatímco T buňky izolované během ústupu nemoci byly k supresi částečně citlivé. Dále je vrcholné stadium nemoci charakteristické velkou početní převahou MOG-specifických efektorových T buněk oproti MOG-specifickým Tregs. Tento poměr se během ústupu nemoci postupně snižuje. MOG-specifické efektorové T buňky z CNS (ale ne lymfatické) sekretují vysoké množství IL-6 a TNF- $\alpha$ . Tyto cytokiny mohou být zodpovědné za rezistenci k supresi. IL-6 v kombinaci s TGF- $\beta$  totiž vytváří ideální cytokinové prostředí pro diferenciaci Th17 buněk a zároveň blokuje vznik nových Tregs. IL-6 také narušuje supresivní efekty ustanovené populace Foxp3+ Tregs. IL-6 je tedy klíčovým faktorem při udržování rovnováhy mezi Tregs a patogenními Th17 buňkami. V cílové tkáni (CNS) závisí schopnost Tregs kontrolovat efektorové T buňky na složení populace efektorových T buněk. Rezistence k supresi je největší během počátečního a vrcholného stadia nemoci, kdy převládají Th17 buňky. Poté ovšem stoupá frakce efektorových T buněk produkujících IFN- $\gamma$  (Th1 buňky) (fáze ústupu nemoci). Během ústupu nemoci jsou T buňky z CNS citlivé vůči působení Tregs a proto se zdá, že Th1 buňky mohou být kontrolovány snadněji než Th17 buňky (74).

## 5.2. CD4+ Tregs v systémových autoimunitních onemocněních: SLE- systémový lupus erythematoses

SLE je, oproti orgánově specifickým autoimunitním chorobám (diabetes 1. typu nebo roztroušená skleróza), systémovou autoimunitní chorobou, která napadá více tkání a orgánů. Jedná se o zánětlivé multigenetické onemocnění charakteristické nekontrolovanou autoreaktivitou CD4+ T buněk a B lymfocytů vedoucí k vysoké produkci autoprotilátů IgG namířených proti vlastním antigenům- především proti antigenům lokalizovaným v jádře. Počáteční narušení lymfocytární tolerance je důsledkem kombinace environmentálních a genetických faktorů a později vedou nekontrolované autoimunitní reakce k patogenezi- typickými příznaky lupusu jsou kožní léze a glomerulonefritida (75). Většina studií myších

modelů SLE napovídá, že centrální tolerance je neporušená a proto je pravděpodobné, že k její kritické ztrátě dochází v periférii. Analýzy vzorků lidské krve prokázaly snížený počet cirkulujících CD4+CD25<sup>high</sup> Tregs u dospělých pacientů v aktivní fázi onemocnění (76, 77). Toto bylo potvrzeno i jednou současnou studií, jejíž autoři se jako první zároveň zaměřili i na analýzu jiných typů Tregs, než jsou CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+ T buňky (brané jako nTregs) a překvapivě zjistili, že počet CD4+CD25<sup>-low</sup>Foxp3+ Tregs (i když není jasné, zda adaptivní Tregs mohou vznikat in vivo v podmínkách lidských zánětlivých chorob, je možné předpokládat, že by tyto buňky mohly teoreticky představovat adaptivní Tregs indukované během imunitních odpovědí) se během aktivní fáze SLE zvyšuje. Toto zvýšení ale zřejmě není dostatečné pro kompenzaci úbytku CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+ Tregs a i přes tento nárůst převažují patogenní efektorové T buňky v aktivní i inaktivní fázi onemocnění početně nad CD4+CD25<sup>-low</sup>Foxp3+ Tregs oproti zdravým kontrolám. Je tedy možné, že patogeneze SLE může být spojena i s nerovnováhou mezi počty CD4+CD25<sup>-low</sup> Tregs a efektorových T buněk (76). Bylo prokázáno, že úbytek v krvi cirkulujících nTregs během aktivní fáze nemoci není důsledkem migrace těchto buněk do LNů nebo do míst zánětu (přítomnost těchto buněk se neprokázala ani v LNů, ani v ledvinách), ale může být způsoben citlivostí nTregs vůči apoptose indukované FasL (CD95L) (77) (CD4+CD25<sup>high</sup>Foxp3+ Tregs jsou převážně buňky s paměťovým fenotypem s vysokou expresí CD95, což vysvětluje jejich citlivost k apoptose navozené CD95L. CD4+CD25<sup>low</sup>Foxp3+ Tregs mají naopak převážně naivní fenotyp s nízkou expresí CD95 a proto jsou rezistentní k apoptose indukované CD95L (78). Analýzy funkcí Tregs v pacientech se SLE nepřináší žádné jednoznačné výsledky. Zatímco některá data podporují přítomnost normálních, funkčních CD4+CD25<sup>high</sup> T buněk v inaktivní i aktivní fázi nemoci (76, 77), jiná ukazují na funkční defekt těchto buněk v pacientech s aktivní formou SLE. Tyto rozpory mohou být způsobeny použitím různých stimulačních podmínek in vitro. I přes kontroverzní výsledky se však zdá, že spíše počet CD4+CD25<sup>high</sup> Tregs než jejich funkce, je rozhodujícím aspektem v progresi onemocnění, protože tyto buňky izolované z pacientů trpících SLE mají stejné funkční fenotypické charakteristiky jako Tregs zdravých osob (77). Účast jiných typů CD4+Foxp3+Tregs na supresi autoreaktivních buněk je nejasná, protože nebylo potvrzeno, že by CD4+CD25<sup>-low</sup>Foxp3+ Tregs v pacientech se SLE vykazovaly supresorové aktivity (76). Není také známo, jak Tregs působí na humorální (protilátkovou) imunitu a tedy jak kontrolují produkci protilátek v SLE (produkce autoproti látek třídy IgG je důležitá pro patogenezi SLE). Obecně jsou Tregs schopny suprimovat aktivaci B buněk jak

přímo, tak nepřímo prostřednictvím inhibice Th2 buněk (79). Současná data napovídají, že preaktivované Tregs jsou in vitro také schopny B buňky i zabít. Zda se toto odehrává v podmínkách autoimunitních chorob, musí být ovšem analyzováno (80). Bylo pouze prokázáno, že poměr CD4+Foxp3+ Tregs a efektorových T buněk nepřímo koreluje s množstvím autoprotilátek IgG proti dsDNA v pacientech s inaktivním SLE. Funkční nebo početní pokles CD4+Foxp3+ Tregs oproti efektorovým T buňkám by pak mohl být počátkem narušené tolerance pacientů se SLE (bohužel podobný vztah mezi poměrem Tregs/efektorové T buňky a hladinou IgG nebyl nalezen v pacientech s aktivním SLE) (76). Některé studie na myších potvrzují, že Tregs mají protektivní roli a chrání myš proti produkci autoprotilátek (i když ji nechrání proti konečné orgánové patologii). Podobně jako lidské Tregs, mohou mít i myši Tregs deficit (ať už početní nebo funkční). V myším modelu NZM2410 byl objeven Sle1 lokus, který hraje klíčovou roli v citlivosti vůči SLE, kontroluje toleranci k jaderným antigenům a ovlivňuje T i B buňky. Skládá se z více lokusů, ale bylo prokázáno, že za vznik autoreaktivních T buněk je do velké míry zodpovědný lokus Sle1a, který je také spojen s redukcí počtu CD4+CD25+CD62L+Foxp3+ Tregs (zdá se, že Sle1a kontroluje spíše počet Tregs než jejich funkci). Exprese Sle1a posiluje aktivaci, proliferaci a efektorové funkce CD4+ T buněk (produkce cytokinů) a zároveň snižuje množství CD4+CD25+Foxp3+ Tregs, což vede k produkci autoreaktivních T buněk, které podporují produkci autoprotilátek B buňkami specifickými na chromatin. CD4+ T buňky exprimující Sle1a mají totiž zvýšenou úroveň kostimulační molekuly ICOS, která je kritická při pomoci Th2 buněk B buňkám (zvýšená stimulace T buněk prostřednictvím ICOS vede ke zvýšené produkci anti-dsDNA protilátek B buňkami). Exprese Sle1a může také efektorovým T buňkám udělit rezistenci k supresi zprostředkované Tregs. Tohoto procesu by se mohly pravděpodobně účastnit DCs, v nichž exprese Sle1a vyvolává nadprodukcí IL-6, který je znám svými negativními účinky na Tregs (81).

## 6. Terapeutické využití Tregs pro léčbu autoimunitních chorob

Mnoho autoimunitních onemocnění je spojeno s redukováným počtem a/nebo funkcemi Tregs. Proto byly navrženy terapie, jak je posílit v jejich množství a/nebo funkcích in vivo (např. použití monoklonálních protilátek proti povrchovým molekulám (např. proti CD3-  $\epsilon$  řetězci

TCR komplexu, CD28 nebo CD52, proti prozánětlivým cytokinům (např. TNF- $\alpha$ ) nebo použití protizánětlivých cytokinů (IL-10, TGF- $\beta$ ) (shrnutí v 82). Řada z těchto terapií již byla uvedena do klinické praxe a i když některé studie vykazují pozitivní výsledky (např. léčba pacientů s diabetem 1. typu anti-CD3 monoklonálními protilátkami zabraňuje progresi onemocnění po značně dlouhou dobu (83)), jiné výsledky dokumentují relativní nespecifičnost těchto terapií, která je asociována s vedlejšími účinky (např. monoklonální protilátky proti povrchovým molekulám mohou působit jak na Tregs, tak na efektorové T buňky (řada těchto molekul je exprimována jak na povrchu Tregs, tak na povrchu efektorových T buněk- běžně nebo po jejich aktivaci), což může potenciálně vést k posílení imunitních odpovědí a ke zhoršení onemocnění). Kvůli těmto rizikům je současný výzkum zaměřen na nalezení specifitějších metod, které by redukovaly nebo předcházely autoimunitním patologiím. Možným řešením může být buněčná terapie založená na adoptivním transferu Tregs. Transfer Tregs (polyklonálních či antigenně-specifických) byl použit v řadě myších modelů autoimunitních chorob, ze kterých je patrné, že jsou tyto buňky (především CD4+CD25+ Tregs) schopny předejít a/nebo zvrátit již probíhající autoimunitní chorobu (účinnost byly prokázána v modelech SLE, diabetu 1. typu, EAE (MS) a dalších) (shrnutí v 82). I když jsou tyto výsledky příslibem pro léčbu lidských autoimunitních onemocnění, v současné době však neexistují klinické studie imunoterapie založené na Tregs. Souvisí to s řadou problémů spojených s manipulací lidských Tregs. Pro buněčnou terapii je potřeba izolovat dostatečně čistou populaci Tregs, tak aby byla zajištěna bezpečnost a nedocházelo ke kontaminaci patogenními T buňkami. I když existují metody pro izolaci lidských polyklonálních Tregs z periferní krve (např. využití průtokové cytometrie pro separaci na základě exprese povrchových molekul- např. separace CD4+ T buněk s nejvyšší expresí CD25 (CD25<sup>high</sup>) (57) nebo CD4+CD25+CD127<sup>-low</sup> T buněk (23)) a izolovaná buněčná populace je značně obohacena o Foxp3+ Tregs, tato populace vždy obsahuje malou frakci neregulačních efektorových T buněk. Při expanzi Foxp3+Tregs in vitro (použití silného stimulu přes TCR (např. anti-CD3 protilátky) a kostimulačního signálu (anti-CD28 protilátky) v přítomnosti IL-2; popřípadě rapamycinu, který stabilizuje expresi Foxp3 a supresorové funkce nebo určitých typů DCs, které dodají optimální signály pro jejich expanzi (shrnutí v 82)) navíc může docházet k dalšímu poklesu jejich procentuálního množství a proto je použití této expandované populace pro in vivo aplikaci sporné. Navíc není jasné, zda budou tyto Tregs stabilní a funkční in vivo a v případě, že ano, zda podání velkého počtu těchto buněk



nepovede k systémové imunosupresi (jedná se totiž o polyklonální Tregs). Z myších modelů autoimunit je patrné, že polyklonální Tregs jsou účinnější při regulaci systémových autoimunitních onemocnění (např. SLE) než orgánově-specifických onemocnění (např. diabetes 1. typu) (patrně proto, že antigeny vyvolávající SLE (dsDNA a jaderné antigeny) jsou přítomny po celém těle a Tregs specifické pro tyto antigeny mohou být udržovány v daleko větších množstvích v periferních LN a slezině v porovnání např. s Tregs specifickými pro antigeny pankreatických ostrůvků, které se přednostně akumulují v pankreatických LN (shrnuto v 60)). Ideálním řešením pro léčbu orgánově-specifických chorob naopak mohou být více cílené terapie založené na antigenně-specifických Tregs (např. MBP nebo MOG-specifické v případě MS nebo Tregs specifické pro antigeny pankreatu (insulin) v případě diabetu 1. typu). Bohužel současné technologie nedovolují izolovat a expandovat dostatečné množství těchto buněk pro klinické použití. Možnost jak obejít tuto překážku spočívá ve využití virových transgenů pro vytvoření Tregs s požadovanou antigenní specifitou z polyklonálních Tregs. Do izolovaných polyklonálních Foxp3<sup>+</sup>Tregs by mohly být integrovány terapeutické genové kazety exprimující více transgenů- např. geny kódující požadované TCRs, imunoregulační cytokiny (např. IL-10), chemokinové receptory a receptory pro homing do cílových tkání (shrnuto v 82). Nadějná je také možnost vytvořit antigenně-specifické Foxp3<sup>+</sup> Tregs z izolovaných antigenně-specifických efektorových T buněk expandovaných in vitro. V současnosti byly vytvořeny lidské Tregs s použitím metody založené na expresi Foxp3 prostřednictvím lentiviru a tyto buňky jsou funkčně ekvivalentní s klasickými Foxp3<sup>+</sup>Tregs (84). Konvenční T buňky by také in vitro mohly dát vznik iTregs- např. Tr1 buňkám (použití IL-10, vitamínu D3, dexamethasonu, nezralých nebo tolerogenních DCs (44)), které by následně byly použity pro imunoterapii. Předpokládá se, že terapie založené na Tregs budou krátkodobé, které navodí tolerogenní prostředí vedoucí k obnovení regulačních mechanismů im. systému. V některých případech budou muset být ovšem použity opakované dávky funkčních Tregs nebo podány geneticky upravené buňky- např. u onemocnění způsobených funkčním defektem v samotných Tregs. Je také pravděpodobné, že terapeutický zásah by měl proběhnout velmi brzy po vypuknutí onemocnění, protože v pokročilém stadiu je prostředí plné prozánětlivých cytokinů, které posilují aktivaci efektorových T buněk a může tudíž být obtížné indukovat toleranci.

## 7. Závěr

Tolerance vůči tkáním vlastního těla (a tedy ochrana proti vzniku autoimunity) je udržována řadou mechanismů. Dnes je jasné, že velice důležitým mechanismem je aktivní regulace zprostředkovaná buňkami imunitního systému. V posledních 10 letech byla pozornost soustředěna především na regulační T buňky (Tregs) a mezi nimi CD4<sup>+</sup> Tregs (z nichž nTregs hrají hlavní roli při potlačování periferní autoreaktivity). CD4<sup>+</sup> Tregs působí přímo i nepřímo na různé typy buněk a vykonávají celou řadu funkcí, kterými nejen suprimují odpovědi na vlastní antigeny, ale také regulují probíhající imunitní reakce na cizí antigeny. Z hlediska ochrany před vznikem autoimunitního onemocnění je ovšem důležitá především jejich schopnost suprimovat proliferaci, diferenciaci a efektorové funkce autoreaktivních T buněk během primingu v LN a zabránit tak invazi těchto buněk do tkání, kde by se následně mohly rozvinout patologické reakce. Některé studie také nasvědčují tomu, že jsou Tregs schopny fungovat v cílových tkáních během již probíhajícího zánětu a mohou tak potlačovat poškození tkáně. Proto jejich dysfunkce (způsobená defektem v nich samotných nebo okolními faktory) nebo snížený počet mohou vést ke vzniku dysregulovaných imunitních odpovědí, které podporují vznik a progresi autoimunitního onemocnění. Pro přesné pochopení role, jakou tyto buňky hrají v autoimunitním procesu, bude nutné lépe porozumět tomu, jak, kde a kdy vykonávají supresivní funkce a jaké jsou cíle jejich působení. S tím je spojena nutnost identifikace spolehlivějších markerů a funkčně důležitých molekul, která bude také nezbytná pro zajištění účinnosti a bezpečnosti léčebných terapií založených na adoptivním transferu těchto buněk. Na druhou stranu totiž přehnaná suprese jinak fyziologické imunitní odpovědi představuje velké nebezpečí z hlediska vzniku nádorového onemocnění nebo chronického zánětu. Přesná regulace imunitních odpovědí je tedy zcela kruciólní z hlediska zajištění optimální obranyschopnosti organismu vůči nežádoucím zevním, ale i vnitřním vlivům.

## Seznam literatury

1. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18: 723-737, 1970
2. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T-cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164, 1995
3. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN. Regulatory T-cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007, 2007: 89195
4. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2: 301-306, 2001
5. Koonpaew S, Shen S, Flowers L, Zhang W. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *J Exp Med* 203: 119-129, 2006
6. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-352, 2005
7. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10: 1969-1980, 1998
8. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167: 1245-1253, 2001
9. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C. Regulatory CD4+ T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10: 371-378, 1998
10. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2 regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8: 615-623, 1998
11. Bensinger SJ, Walsh PT, Zhang J, Carrol M, Parsons R, Rathmell JC, Thompson CB, Burchill MA, Farrar MA, Turka LA. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172: 5287-5296, 2004
12. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68-73, 2001

13. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of Foxp3. *Nat Genet* 27: 20-21, 2001
14. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061, 2003
15. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336, 2003
16. Chen C, Rowell EA, Thomas RM, Hancock WW, Wells AD. Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem* 281: 36828-36834, 2006
17. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446: 685-689, 2007
18. Coleman CA, Muller-Trutwin MC, Apetrei C, Pandrea I. T regulatory cells: aid or hindrance in the clearance of disease? *J Cell Mol Med* 11: 1291-1325, 2007
19. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-787, 2008
20. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 16: 89-98, 2004
21. Engelhardt JJ, Sullivan TJ, Allison JP. CTLA-4 overexpression inhibits T cell responses through a CD28-B7-dependent mechanism. *J Immunol* 177: 1052-1061, 2006
22. Huehn J, Hamann A. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 26: 632-636, 2005
23. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with Foxp3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells. *J Exp Med* 203: 1701-1711, 2006
24. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. Human CD25+CD4+ T suppressor cells clones produce TGF-beta, but not IL-10 and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 196: 1335-1346, 2002

25. Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+CD4+ T-cell receptors. *Immunity* 21: 267-277, 2004
26. Buenafe AC, Tsaknaridis L, Spencer L, Hicks KS, McMahan RH, Watson L, Culbertson NE, Latocha D, Wegmann K, Finn T et al. Specificity of regulatory CD4+CD25+ T cells for self- T cell receptor determinants. *J Neurosci Res* 76: 129-140, 2004
27. Cosmi L, Liotta F, Angeli R, Mazinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Lasagni L, Vanini V, Romagnani P, Maggi E et al. Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25+ regulatory thymocyte because of their responsiveness to different cytokines. *Blood* 103: 3117-3121, 2004
28. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 182: 58-67, 2001
29. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10398-10403, 2004
30. Mann DH, Sharma MD, Lee JR et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297: 1867-1870, 2002
31. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 1206-1212, 2003
32. Cederbom L, Hall H, Ovare F. CD4+CD25+ regulatory T-cells downregulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 30: 1538-1543, 2000
33. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21: 589-601, 2004
34. Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T (R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197: 111-119, 2003
35. Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 80: 458-470, 2006
36. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Tregs) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148: 32-46, 2007

37. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15: 297-322, 1997
38. Hoeve MA, de Savage ND et al. Divergent effects of IL-2 and IL-23 on the production of IL-17 by human T cells. *Eur J Immunol* 36: 661-670, 2006
39. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17 producing T cells. *Immunity* 24: 179-189, 2006
40. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19: 1-6, 2007
41. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 199: 1401-1408, 2004
42. Chen W, Jin W, Hardegen N et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198: 1875-1886, 2003
43. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204: 1757-1764, 2007
44. Levings MK, Roncarolo MG. Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 293: 303-326, 2005
45. Stassen M, Fondel S, Bopp T, Richter C, Muller C, Kubach J, Becher C, Knop J, Enk AH, Schmidt S et al. Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha4beta7 or alpha4beta1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 34: 1303-1311, 2004
46. Thorstenson KM, Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD25+CD4+ T-cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 167: 188-195, 2001
47. Franzke A, Hunger JK, Dittmar KEJ, Ganser A, Buer J. Regulatory T-cells in the control of immunological diseases. *Ann Hematom* 85: 747-758, 2006
48. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, IL-10. *J Immunol* 172: 5213-5221, 2004

49. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182: 68-79, 2001
50. Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomani G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune response. *J Invest Dermatol* 114: 295-302, 2000
51. Moore KW, O'Garra A, de Waal MR, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11: 165-190, 1993
52. Kitani A, Chua K, Nakamura K, Strober W. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 165: 691-702, 2000
53. Strobl H, Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* 1: 1283-1290, 1999
54. Thomas D, Zaccane P, Cooke A. The role of regulatory T cell defects in type 1 diabetes and the potential of these cells for therapy. *Rev Diab Stud* 2: 9-18, 2005
55. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TIM. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92-99, 2005
56. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ et al. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+CD25+ T cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 1407-1414, 2005
57. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 24: 55-62, 2005
58. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6: 1182-1190, 2005
59. Michie SA, Sytwu HK, McDevitt JO, Yang XD. The role of alpha4-integrins in the development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr Top Microbiol Immunol* 231: 65-83, 1998
60. Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev* 212: 217-237, 2006
61. Danese S, Rutella S. The Janus face of CD4+CD25+ regulatory T cells in cancer and autoimmunity. *Curr Med Chem* 14: 649-666, 2007

62. Sarween N, Chodos A, Raykundalia C, Khan M, Abbas AK, Walker LS. CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol* 173: 2942-2951, 2004
63. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1033-1036, 2003
64. Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA. Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J Clin Immunol* 28: 697-706, 2008
65. Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199: 971-979, 2004
66. Astier AL et al. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116: 3252-3257, 2006
67. Huan J, Culbertson N, Spencer L et al. Decreased Foxp3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 81: 45-52, 2005
68. Venken K, Hellings N, Hensen K et al. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and Foxp3 expression. *J Neurosci Res* 83: 1432-1446, 2006
69. Venken K, Hellings N, Thewissen M et al. Compromised CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of Foxp3 positive cells and a reduced Foxp3 expression at the single-cell level. *Immunology* 123: 79-89, 2007
70. Vandenberg AA, Offner H. Critical evaluation of regulatory T cells in autoimmunity: are the most potent regulatory specificities being ignored? *Immunology* 125: 1-13, 2008
71. Kohm AP, Williams JS, Miller SD. Cutting edge: ligation of the glucocorticoid-induced TNF receptor enhances autoreactive CD4+ T cell activation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 172: 4686-4690, 2004
72. McGeachy M, Stephens LA, Anderson SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175: 3025-3032, 2005



73. Hori S, Haury M, Coutinho A, Demengeot J. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8213-8218, 2002
74. Korn T, Anderson AC, Bettelli E, Oukka M. The dynamics of effector T cells and Foxp3+ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol* 191: 51-60, 2007
75. Mok CC et al. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56: 481-490, 2003
76. Suen JL, Li HT, Jong YJ, Chiang BL, Yen JH. Altered homeostasis of CD4+Foxp3+ regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology* 1-10, 2008
77. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175: 8392-8400, 2005
78. Fritzsching B, Oberle N, Pauly E et al. Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood* 108: 3371-3378, 2006
79. Fields ML, Hondowicz BD, Metzgar MH, Nish SA, Wharton GN, Picca CC, Caton RJ, Erikson J. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit maturation but not the initiation of an autoantibody response. *J Immunol* 175: 4255-4264, 2005
80. Zhao DM, Thornton AM, Dipaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107: 3925-3932, 2006
81. Cuda CM, Wan S, Sobel EJ, Croker BP, Morel L. Murine lupus susceptibility locus Sle1a controls regulatory T cell number and function through multiple mechanisms. *J Immunol* 179: 7439-7447, 2007
82. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone AJ. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev* 223: 371-390, 2008
83. Herold KC et al. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1 (Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 1763-1769, 2005
84. Allan SE et al. Generation of potent and stable humans CD4+ T regulatory cells by activation-independent expression of Foxp3. *Mol Ther* 16: 194-202, 2008