

## BIOLOGIA NATURALNYCH LIMFOCYTÓW REGULATOROWYCH CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>\*

### BIOLOGY OF NATURALLY ARISING CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> REGULATORY T CELLS

Monika RYBA, Jolanta MYŚLIWSKA

Katedra Histologii i Immunologii, Zakład Immunologii,  
Akademia Medyczna w Gdańsku

**Streszczenie:** Limfocyty T regulatorowe o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) odgrywają istotną rolę w immunosupresji. Zaburzenia ilościowe lub jakościowe w populacji tych komórek mogą być przyczyną rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. W powstawaniu i regulowaniu funkcji limfocytów T regulatorowych ważną rolę pełni gen *Foxp3* należący do czynników transkrypcyjnych. Zarówno na poziomie mRNA, jak i białka ekspresja *Foxp3* jest ograniczona do komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. *Foxp3* hamuje ekspresję genów cytokin na skutek oddziaływań z jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych – NFAT. Wzbudzenie ekspresji *Foxp3* w komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nadaje im w pełni funkcjonalny fenotyp regulatorowy. To odkrycie daje nowy obraz biologii limfocytów T regulatorowych i może przyczynić się do rozwoju terapii w leczeniu schorzeń na podłożu immunologicznym.

**Słowa kluczowe:** komórki regulatorowe, *Foxp3*, choroby autoimmunizacyjne.

**Summary:** The mechanism that plays an essential role in immunosuppression and regulation is the presence of naturally arising CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes (Treg). Quantitative or qualitative dysfunctions in these cells may lead to autoimmune diseases. The *Foxp3*, a forkhead/winged helix (FKH) transcription factor, is the key regulatory gene for the development and function of regulatory T lymphocytes. The *Foxp3* expression is limited to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells at both mRNA and protein levels. The *Foxp3* interacts with nuclear factor of activated T cells (NFAT) and repress cytokine gene expression. Induction of the *Foxp3* expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells can convert these cells to a regulatory T cell phenotype. This finding may provide new insight into the biology of regulatory T cells and could become a useful therapeutic tool in the treatment of autoimmunity.

**Key words:** regulatory T cells, *Foxp3*, autoimmunity.

\*Praca została wykonana w ramach badań statutowych AMG (ST-26 – kierownik prof. J. Myśliwska).

## CHARAKTERYSTYKA REGULATOROWYCH KOMÓREK CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Treg) stanowią od 5 do 10% wszystkich obwodowych komórek CD4<sup>+</sup> [25, 34] i charakteryzują się stałą i wysoką ekspresją podjednostki  $\alpha$  receptora dla IL2 (CD25), co odróżnia je od aktywowanych limfocytów CD4<sup>+</sup>. U człowieka opisano dwie subpopulacje limfocytów T regulatorowych: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> i CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> [3, 5], z których tylko pierwsza, wykazująca wyższą ekspresję antygenu CD25, ma w pełni supresorowy fenotyp. Subpopulacja ta stanowi 1–2% komórek CD4<sup>+</sup> [5]. Dodatkowo limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dzieli się na te, które wykazują, bądź nie wykazują ekspresji antygenu CD45RO [26, 49]. Analiza FACS wykazała ponadto ekspresję następujących cząsteczek powierzchniowych na świeżo izolowanych limfocytach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [2, 26]: HLA-DR, CD-122, CD134, wewnątrzkomórkowego receptora CTLA-4. Jeszcze bardziej charakterystyczny dla tych komórek jest znajdujący się na błonie komórkowej indukowany glukokortykoidami receptor dla TNF – GITR (ang. *glucocorticoid induced tumour necrosis factor receptor*) [4, 31]. Fenotyp powierzchniowy Treg jest bardzo podobny do tego, jaki wykazują komórki CD4<sup>+</sup> pamięci, z tą różnicą, że Treg charakteryzują się konstytutywną ekspresją CD25 i CTLA-4 [2, 3]. Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mają krótsze telomery niż limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [3]. Nie wiadomo jednak, czy może to być powodem ich ograniczonej zdolności do proliferacji. Limfocyty T regulatorowe dojrzewają w grasicy lub w obwodowych narządach limfatycznych jako limfocyty rozpoznające własne antygeny. W selekcji limfocytów T regulatorowych w grasicy dużą rolę odgrywa stopień powinowactwa receptorów TCR (ang. *T cell receptor*) do antygenów [1]. Uważa się, że tymocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ulegają negatywnej selekcji w wyniku oddziaływań pomiędzy TCR o dużym powinowactwie i antygenów prezentowanych w kontekście MHC klasy II na komórkach nabłonkowych grasicy. W takich tymocytach dochodzi do wzbudzenia ekspresji genu *Foxp3* i różnicowania w kierunku Treg. Tymocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> stają się anergiczne, co chroni je przed delecją w procesie selekcji pozytywnej. Sygnał pochodzący z TCR o określonym powinowactwie jest niezbędny dla różnicowania w kierunku Treg, ale może być on sygnałem niewystarczającym. Rolę mogą tu odgrywać sygnały pochodzące od innych cząsteczek np. *Notch* [11]. Badania Walker et al. [45], a także Taams et al. [42] pokazały, że limfocyty Treg mogą powstawać również poza grasicą w wyniku wielokrotnej stymulacji antygenem dziewiczych limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>.

## AKTYWNOŚĆ PROLIFERACYJNA KOMÓREK CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

W celu zbadania zdolności proliferacyjnych komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> oraz CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> przeanalizowano zachowanie tych dwóch populacji w hodowli po stymulacji TCR. Okazało się, że limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> wykazywały wysoki potencjał proliferacyjny, natomiast limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nie proliferowały lub proliferowały bardzo słabo w

odpowiedzi na stymulację przeciwciałami anti-CD3 czy anti-CD28. Taka sama sytuacja powtarzała się nawet po wielokrotnej stymulacji, dowodząc, że limfocyty Treg są limfocytami anergicznymi [35]. Obserwowany ograniczony potencjał proliferacyjny anergicznym limfocytów Treg jest prawdopodobnie wynikiem zatrzymania się tych komórek w fazie G1/G0 cyklu komórkowego [26]. Proliferacja limfocytów Treg może być jednak indukowana przez dodanie do hodowli dużych ilości IL-4 czy IL-15 [2, 26, 35]. Również dodanie do pożywki IL-2 przełamuje stan anergii [2] i jest prawdopodobnie wynikiem oddziaływań w kompleksie receptora dla IL-2 (CD25, CD122, CD132). Limfocyty CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nie wydzielają IL-2 [2], ale ta cytokina jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania i przeżycia Treg [7, 11, 41]. Sygnalizacja poprzez IL-2 wydaje się być krytycznym czynnikiem w utrzymaniu homeostazy w populacji limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [19]. Podanie zdrowym myszom przeciwciał anti-IL2 powodowało zmniejszenie odsetka limfocytów Treg w grasicy i na obwodzie prowadząc do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych. Eksperymenty pokazują, że Treg konkurują o IL-2 z komórkami efektorowymi CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [11, 14]. W hodowlach mieszanych poziom ekspresji CD25 na Treg wzrasta, podczas gdy na komórkach efektorowych ekspresja CD25 jest hamowana. Nadekspresja CD25 przez Treg jest hamowana po dodaniu przeciwciał anti-CD25, a dodanie IL-2 przywraca ekspresję CD25 na komórkach efektorowych [14].

## FUNKCJE KOMÓREK CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Limfocyty T regulatorowe są zdolne zarówno do hamowania proliferacji i wydzielania cytokin przez limfocyty efektorowe CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, jak również działają supresyjnie w stosunku do limfocytów CD8<sup>+</sup>, monocytów, komórek NK, komórek dendrytycznych [3, 26], a także mogą w sposób bezpośredni hamować produkcję przeciwciał przez limfocyty B [30]. Aktywność supresyjna Treg zwiększa się po stymulacji TCR [43]. Po stymulacji anti-CD3 w obecności IL-2 wykazano, że wzbudzenie proliferacji w limfocytach T regulatorowych nie ogranicza ich zdolności supresyjnych w stosunku do komórek efektorowych [35], co stwarza możliwości ich wykorzystania w terapii. Badania nad mechanizmem supresji wywieranej przez limfocyty Treg pokazały, że może być ona niezależna od cytokin [26, 35]. Zastosowanie przeciwciał anti-IL-4, anti-IL-10, anti-TGF-β lub kombinacji tych przeciwciał nie blokowało supresji wywieranej przez limfocyty Treg w hodowlach mieszanych z limfocytami efektorowymi [26, 35]. Dopiero oddzielenie komórek Treg od komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> błoną półprzepuszczalną znosiło supresję. Jednak zdania na temat roli TGF-β są podzielone. Badania Nakamura et al. [33] pokazały, że blokowanie tej cytokiny obniżało zdolność limfocytów T regulatorowych do wygaszania odpowiedzi immunologicznej. Inne doświadczenia pokazały, że rzeczywiście limfocyty Treg oddziałują na komórki docelowe za pośrednictwem TGF-β, ale nie w formie rozpuszczalnej, lecz związanej z błoną komórkową [34]. Być może supresja zależna od kontaktu komórka - komórka jest dominującą formą supresji [2], gdyż w pewnych warunkach nie można ominąć

mechanizmów zależnych od cytokin i w regulacji odpowiedzi immunologicznej konieczny jest udział IL-10 czy TGF- $\beta$  [15]. Wyjaśnieniem tych dwóch sprzecznych mechanizmów działania Treg może być tzw. teoria zaraźliwej tolerancji (ang. *infectious tolerance*) [11, 25], według której limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w kontakcie z limfocytami T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> pobudzają je do produkcji IL-10 i TGF- $\beta$ . W ten sposób powstają anergiczne limfocyty Th<sup>sup</sup> (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> po kontakcie z Treg), które są zdolne do hamowania limfocytów efektorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> poprzez wydzielane cytokiny IL-10 lub/i TGF- $\beta$ .

## ROLA CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO FOXP3

Jednym z ostatnich odkryć dotyczących biologii limfocytów T regulatorowych jest identyfikacja czynnika transkrypcyjnego Foxp3, który po raz pierwszy został opisany właśnie w tych komórkach [18] i który uważany jest za najlepszy marker limfocytów Treg [39]. Gen *Foxp3* zlokalizowany jest w regionie X p 11.23 [6]. *Foxp3* koduje białko o masie 48 kDa, długości 431 aminokwasów – skurfinę (SFN) [40]. U myszy z mutacją w genie *Foxp3*, tzw. myszy *sf* (ang. *scurfy*) komórki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> powstają, ale nie wykazują one właściwości regulatorowych [17, 27]. Skutki wynikające z mutacji bądź też delekcji genu *Foxp3* są podobne do tych powstałych po usunięciu populacji limfocytów T regulatorowych, a więc rozwoju chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. To skłoniło naukowców do badania udziału genu *Foxp3* w rozwoju i funkcjonowaniu limfocytów CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Mutacja *sf* w genie *Foxp3* polega na insercji dwóch par zasad w regionie kodującym [40], co prowadzi do przedwczesnej terminacji i w efekcie obniżenia ekspresji genu [27]. Skurfina (SFN) zawiera tzw. domenę FKH (ang. *forkhead/winged helix domain*) na swym C-końcu. Usunięcie tej domeny powoduje zatrzymanie białka w cytoplazmie i jego eliminację z jądra komórkowego [40]. Wprowadzenie do komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> białka SFN pozbawionego domeny FKH nie wzbudzało aktywności supresyjnej w tych komórkach [22]. U myszy *sf* ekspresja cytokin, takich jak: IL-2, IL-4, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , jest zaburzona. Główną rolę w regulacji genów dla tych cytokin pełni czynnik transkrypcyjny NFAT (ang. *nuclear factor of activated lymphocytes*). Wykazano, że w przypadku braku funkcjonalnego SFN, ekspresja IL2 i innych genów cytokin zależnych od NFAT jest wzmożona, natomiast nadprodukcja SFN hamuje wydzielanie tych cytokin [40]. Przeanalizowano znane sekwencje regulatorowe genów cytokin zależnych od NFAT jako możliwe miejsca wiązania FKH i stwierdzono, że większość z nich znajduje się w bliskim sąsiedztwie NFAT [40]. Poza tym limfocyty T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> od myszy *sf* miały drastycznie zwiększony poziom NFAT i NF- $\kappa$ B w porównaniu z typem dzikim [8]. Można więc przypuszczać, że Foxp3 wpływa na transkrypcję IL-2 i innych cytokin zależnych od NFAT blokując miejsce wiązania NFAT z promotorami genów dla tych cytokin [8]. To może być przyczyną anergii limfocytów T regulatorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i braku syntezy IL-2 przez te komórki. Potwierdziły to doświadczenia, w których wprowadzenie genu *Foxp3* do mysich komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> skutkowało hamowaniem ekspresji

cytokin, takich jak: IL-2, IL-4 czy IFN- $\alpha$  [23]. Wykazano ponad to, że ekspresja Foxp3 może być regulowana przez receptor dla estrogenu, który ma swoje miejsce wiązania w regionie promotorowym genu *Foxp3* [12].

Zarówno na poziomie mRNA, jak i białka ekspresja Foxp3 jest ograniczona do komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [22, 23]. Badania pokazały, że poziom ekspresji mRNA dla Foxp3 był od 40 do 100 razy wyższy w świeżo izolowanych komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w porównaniu z komórkami CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [18, 22, 24, 28, 38]. mRNA dla Foxp3 był również wykrywalny w niedojrzałych tymocytach, ale tylko o fenotypie CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> [23]. Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> od zdrowych myszy słabo reagowały na stymulację TCR, ale hamowały proliferację komórek efektorowych w hodowlach mieszanych. Z kolei limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> od myszy z delecją genu *Foxp3* proliferowały, ale nie wykazywały żadnej aktywności supresyjnej w stosunku do komórek efektorowych. Dodatkowo myszy Foxp3<sup>-/-</sup> miały bardzo powiększone węzły chłonne i śledzionę. Brak ekspresji Foxp3 w innych komórkach CD25<sup>+</sup> (makrofagi, limfocyty B) sugeruje, że ekspresja tego genu jest zarezerwowana dla limfocytów T. Powstaje pytanie, czy ekspresja Foxp3 może być indukowana *in vivo*, a jeśli tak, to w jakich warunkach? Peng et al. [36] sugerują, że takim czynnikiem kostymulującym może być TGF- $\beta$ , który promuje rozwój limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> i dzięki temu chroni przed rozwojem cukrzycy typu 1 u myszy. Przemawiają za tym doświadczenia *in vitro*, w których pod wpływem stymulacji przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 w obecności TGF- $\beta$ , komórki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> włączały ekspresję Foxp3 i nabywały aktywności regulatorowej [10, 51]. TGF- $\beta$  może indukować ekspresję Foxp3 poprzez aktywację SMAD [12].

Inne doświadczenia *in vitro* pokazały, że sama stymulacja TCR przeciwciałami anti-CD3, anti-CD28 w obecności IL2 wystarczała do wzbudzenia ekspresji genu *Foxp3* w ludzkich komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [17, 32, 46]. Indukcja ekspresji genu silnie korelowała z ekspresją cząsteczki powierzchniowej CD25, a komórki CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, które powstawały, wykazywały aktywność regulatorową. Badania te są sprzeczne z podobnymi przeprowadzonymi na mysich komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, w których nie dochodziło do włączenia ekspresji Foxp3 po stymulacji TCR [22, 38, 46]. Wprowadzenie wektora retrowirusowego niosącego gen *Foxp3* do dziewiczych limfocytów T powoduje przejście ich w stan anergii i nadaje im w pełni funkcjonalny fenotyp regulatorowy [17, 18, 24, 49]. Co ciekawe, w transfekowanych komórkach dochodzi również do wzrostu ekspresji cząsteczek powierzchniowych CD25, CD45RO, HLA-DR, CCR-4, CTLA-4, GITR czy CD103 [18, 22, 23]. Zauważono, że im wyższy był poziom mRNA białka Foxp3, tym wyższy poziom ekspresji wyżej wymienionych cząsteczek. Wydaje się mało prawdopodobne, aby było to wynikiem nadmiernej aktywacji komórek przygotowującej je do transfekcji, gdyż poziom innych markerów związanych z aktywacją (CD4, CD38, CD69) nie zmieniał się wraz ze wzrostem ekspresji Foxp3 [49]. Transfekowane limfocyty T CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nie były zdolne do hamowania proliferacji komórek efektorowych CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, gdy były oddzielone od nich błoną półprzepuszczalną [46, 49]. Blokada receptora dla IL-10 lub/i neutralizacja TGF- $\beta$  nie znosiły supresji. Tak więc transfekcja dziewiczych limfocytów T genem *Foxp3* wzbudza potencjał supresorowy w limfocytach T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, a wywierana *in vitro* supresja



jest niezależna od cytokin [18, 24]. Dodatkowo udowodniono, że transfekowane limfocyty T  $CD4^+ Foxp3^+$  zapobiegały rozwojowi chorób autoimmunizacyjnych u myszy [22, 24]. Znaczenie Foxp3 w rozwoju chorób autoimmunizacyjnych potwierdzono również u ludzi. Mutacje w tym genie występują u ludzi z ciężkimi zaburzeniami immunologicznymi IPEX [20, 47] (ang. *immunodysregulation, polyendocrinopathy enteropathy, X-linked syndrome*). Dodatkowo w przebadanej populacji Japończyków z cukrzycą typu 1, wykazano związek polimorfizmu genu *Foxp3* z rozwojem tej choroby [6]. Foxp3 pełni rolę negatywnego regulatora aktywacji limfocytów T, za czym przemawiają następujące spostrzeżenia. Limfocyty T od myszy *sf* były w stanie zaaktywowanym i były nadwrażliwe na stymulację TCR [23]. Silna aktywność transkrypcyjna NFAT skutkowała w nadprodukcji cytokin prozapalnych u tych myszy [11]. Przeciwnie, limfocyty T od myszy z nadekspresją Foxp3 były odporne na stymulację TCR, słabo proliferowały i wydzielały niewielkie ilości IL-2 [28]. Ponadto nadekspresja Foxp3 w komórkach Jurkat powodowała zahamowanie transkrypcji IL-2 po stymulacji anty-CD3, wskazując, że ten białkowy czynnik jest represorem transkrypcji [40]. Z uwagi na fakt, że w transfekowanych limfocytach T  $CD4^+ Foxp3^+$  dochodziło do zwiększenia ekspresji cząsteczek powierzchniowych [22, 23, 49], może on również pełnić rolę aktywatora transkrypcji, jednak brak na to silnych dowodów.

Wyniki badań jednoznacznie pokazują, że Foxp3 pełni główną rolę w powstawaniu i funkcjonowaniu limfocytów T  $CD4^+CD25^+$ , a jego ekspresja w komórkach  $CD4^+CD25^+$  koreluje z ich zdolnością regulatorową. Można więc poszukiwać środków farmakologicznych, które przez wpływ na zwiększenie jego ekspresji, przywracałyby prawidłową funkcję Treg w wielu immunopatologiach.

## ZNACZENIE LIMFOCYTÓW T REGULATOROWYCH $CD4^+CD25^+$ W ROZWOJU CHORÓB AUTOIMMUNIZACYJNYCH

Upośledzenie funkcji limfocytów T regulatorowych może być przyczyną rozwoju chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. U ludzi stwierdzono zaburzenia ilościowe i jakościowe w populacji komórek Treg w przebiegu tych chorób.

U pacjentów z cukrzycą typu 1 zarówno świeżo zdiagnozowaną, jak i przewlekłą stwierdzono zmniejszony odsetek limfocytów T  $CD4^+CD25^+$  [29]. Ponadto wykazano, że Treg chorych na cukrzycę typu 1 słabiej hamowały proliferację limfocytów T efektorowych w warunkach *in vitro* [9, 50]. Limfocyty T  $CD4^+CD25^+$  wyizolowane od pacjentów cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów były anergiczne, zdolne do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych, ale nie do hamowania wydzielania cytokin prozapalnych przez limfocyty efektorowe i monocyty [16]. U osób ze stwardnieniem rozsianym odsetek Treg był porównywalny z odsetkiem u osób zdrowych, jednak zdolność do hamowania proliferacji limfocytów efektorowych i wydzielania przez nie cytokin była obniżona w porównaniu z osobami zdrowymi [44].

Ehrenstein et al. [16] zastosowali terapię anti-TNF jako próbę przywrócenia prawidłowego funkcjonowania limfocytów T regulatorowych w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów. U pacjentów odpowiadających na terapię anti-TNF odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> zwiększył się, co pozostawało w silnej korelacji ze spadkiem poziomu białka CRP (ang. *C-reactive protein*). Przywrócona została również ich funkcja hamowania wydzielania cytokin prozapalnych przez limfocyty efektorowe i monocyty w hodowlach mieszanych.

Badania na myszach NOD (ang. *non-obese diabetic mice*) – modelu zwierzęcym cukrzycy typu 1 u człowieka pokazały, że TNF- $\alpha$  upośledza zdolność limfocytów T regulatorowych do hamowania choroby [48]. Autorzy sugerują, że endogenne TNF- $\alpha$  może wywierać wpływ na funkcję i liczebność limfocytów Treg. Limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> pozyskane z grasicy zdrowych myszy wykazują zwiększoną ekspresję receptora TNFR2 w porównaniu z limfocytami T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, co może skutkować zwiększoną wrażliwością Treg na działanie TNF- $\alpha$ . Potwierdzeniem tego są doświadczenia, w których podanie myszom NOD TNF- $\alpha$  zmniejszało odsetek limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> zarówno w grasicy, jak i śledzionie. Z kolei terapia anti-TNF- $\alpha$  prowadziła do zwiększenia liczby komórek CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i regresji choroby [48]. W innych doświadczeniach poszukujących skutecznych terapii w celu przywrócenia funkcji Treg wykazano, że glikokortykosteroidy mają korzystny wpływ na funkcje Treg w przebiegu stwardnienia rozsianego [13, 37]. Na zwiększenie odsetka limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> u chorych ze stwardnieniem rozsianym ma również wpływ zastosowanie kopolimeru I (COP-I), który przywraca funkcje Treg przez indukcję ekspresji genu *Foxp3* w komórkach CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [21].

## KOMÓRKI REGULATOROWE W IMMUNOTERAPII

Współczesne badania bez wątpienia potwierdzają znaczącą rolę populacji limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej. Możliwość powstawania komórek Treg nie tylko w grasicy, ale też na obwodzie stwarza ogromne możliwości wykorzystania ich w terapii chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, w alergiach czy transplantologii. Odkrycie czynnika transkrypcyjnego *Foxp3* jako głównego regulatora powstawania i funkcjonowania komórek Treg jest krokiem na przód w poznawaniu molekularnych mechanizmów, które nimi rządzą. Kontrola ekspresji genu *Foxp3* jest niezbędna w utrzymaniu homeostazy układu immunologicznego, a określenie sygnałów i mechanizmów prowadzących do zwiększenia lub przywrócenia jego ekspresji w niesfunkcjonalnych limfocytach T regulatorowych daje szansę na przywrócenie ich prawidłowej funkcji w przebiegu wielu chorób na podłożu immunologicznym.

Niedobór Treg może prowadzić do zaburzeń na tle autoimmunizacyjnym. Z kolei nadmierna aktywność może być przyczyną wyciszenia odpowiedzi immunologicznej, a w konsekwencji błędnego rozpoznawania własnych, zmienionych autoantygenów. Dlatego też należy pamiętać, że wszelkie próby modyfikacji tych komórek u ludzi powinny być prowadzone z zachowaniem szczególnej ostrożności.

## LITERATURA

- [1] APOSTOLOU I, SARUKHAN A, KLEIN L, von BOEHMER H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 2002; **3**: 756–763.
- [2] BAECHER-ALLAN C, WOLF E, HAFLER DA. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *Clin Immunol* 2005; **115**: 10–18.
- [3] BAECHER-ALLAN C, VIGLIETTA V, HAFLER DA. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004; **16**: 89–97.
- [4] BAECHER-ALLAN C, VIGLIETTA V, HAFLER DA. Inhibition of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *J Immunol* 2002; **169**: 6210–6217.
- [5] BAECHER-ALLAN C, BROWN JA, FREEMAN GJ, HAFLER DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; **167**: 1245–1253.
- [6] BASSUNY WM, IHARA K, SASAKI Y, KUROMARU R, KOHNO H, MATSUURA N, HARA T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2003; **55**: 149–156.
- [7] BENSINGER SJ, WALSH PT, ZHANG J, CARROLL M, PARSONS R, RATHMELL JC. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2004; **172**: 5287–5296.
- [8] BETTELLI E, DASTRANGE M, OUKKA M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-κB to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 5138–5143.
- [9] BRUSKO TM, WASSERFALL CH, CLARE-SALZLER MJ, SCHATZ DA, ATKINSON MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 1407–1414.
- [10] CHEN WJ, JIN W, HARDEGEN N, LEI K, LI L, MARINOS N, McGRADY G, WAHL SM. Conversion of Peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Naive T Cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells by TGF-β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; **198**: 1875–1886.
- [11] CHORAŻY-MASSAŁSKA M, KONTNY E, MAŚLIŃSKI W: Naturalne komórki regulatorowe (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). *Post Biol Kom* 2006; **33** (1): 71–80.
- [12] COFFER PJ, BURGERING BM: Forkhead – box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 889–899.
- [13] CONSTANTINESCU CS, BRAITCH M, HARIKRISHNAN S: High-dose glucocorticoid treatment for multiple sclerosis relapses enhances the proportion of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Neurol* 2005; **252**: 39.
- [14] de la ROSA M, RUTZ S, DORMINGER H, SCHEFFOLD A. Interleukin 2 is essential for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 2480–2488.
- [15] DIECKMANN D, BRUETT CH, PLOETTNER H, LUTZ MB, SCHULER G. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory interleukin 10-producing, contact – independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med* 2002; **196**: 247–253.
- [16] EHRENSTEIN MR, EVAN JG, SINGH A, MOORE S, WARNES G, ISENBERG DA, MAURIC. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFα therapy. *J Exp Med* 2004; **200**: 277–285.
- [17] FEHÉRVARI Z, SAKAGUCHI S. Development and function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 203–208.
- [18] FONTENOT JD, GAVIN MA, RUDENSKY AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 330–336.
- [19] FONTENOT JD, RASMUSSEN JP, GAVIN MA, RUDENSKY AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; **6**: 1142–1151.
- [20] GOLEVA E, CARDONA ID, OU L, LEUNG DY. Factors that regulate naturally occurring T regulatory cell-mediated suppression. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **116**: 1094–1100.
- [21] HONG J, NINGLI L, ZHANG X, ZHENG B, ZHANG JZ. Induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 6449–6454.
- [22] HORI S, NOMURA T, SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; **299**: 1057–1061.



- [23] HORI S, SAKAGUCHI S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and Infection* 2004; **6**: 745–751.
- [24] JAECKEL E, von BOEHMER H, MANNS MP. Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 306–310.
- [25] JONULEIT H, SCHMITT E, KAKIRMAN H, STASSEN M, KNOP J, ENK AH. Infectious tolerance: human CD25<sup>+</sup> regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4<sup>+</sup> T helper cells. *J Exp Med* 2002; **196**: 255–260.
- [26] JONULEIT H, SCHMITT E, STASSEN M, TUETTENBERG A, KNOP J, ENK AH. Identification and functional characterization of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; **193**: 1285–1294.
- [27] KHATTRI R, COX T, YASAYKO S, RAMSDELL F. An essential role for scurf in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 337–342.
- [28] KHATTRI R, KASPROWICZ D, COX T, MORTRUD M, APPLEBY MW, BRUNKOW ME, ZIEGLER SF, RAMSDELL F. The amount of scurf protein determines peripheral T-cell number and responsiveness. *J Immunol* 2001; **167**: 6312–6320.
- [29] KUKREJA A, COST G, MARKER J, ZHANG C, SUN Z, LIN-SU K, TEN S, SANZ M, EXLEY M, WILSON B, PORCELLI S, MACLAREN N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002; **109**: 131–140.
- [30] LIM WH, HILLSAMER P, BANHAM AH, KIM CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2005; **175**: 4180–4183.
- [31] McHUGH RS, WHITTERS MJ, PICCIRILLO CA, YOUNG DA, SHEVACH EM, COLLINS M, BYRNE MC. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; **16**: 311–323.
- [32] MORGAN ME, van BILSEN JHM, BAKKER AM, HEEMSKERK B, SCHILHAM MW, HARTGERS FC, ELFERING BG, van der ZANDEN L, de VRIES RRP, HUIZINGA WJ, OTTENHOFF THM, TOES REM. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005; **66**: 13–20.
- [33] NAKAMURA K, KITANI A, FUSS I, PEDERSEN A, HARADA N, NAWATA H, STROBER W. TGF- $\beta$  plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both human and mice. *J Immunol* 2004; **172**: 834–884.
- [34] NAKAMURA K, KITANI A, STROBER W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\alpha$ . *J Exp Med* 2001; **194**: 629–644.
- [35] NG WF, DUGGAN PJ, PONCHEL F, MATARESE G, LOMBARDI G, EDWARDS AG, ISAACS JD, LECHLER R. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; **98**: 2736–2744.
- [36] PENG Y, LAOUAR Y, LI MO, GREEN A, FLAVELL RA. TGF- $\beta$  regulates *in vivo* expansion of Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 2004; **101**: 4572–4577.
- [37] PUTHETI P, MORRIS M, STAWIARZ L, TELESHOVA N, KIVISAKK P, PASHENKOV M, KOUWENHOVEN M, WIBERG MK, BRONGE L, HUANGYM, SONDERSTORM M, HILLERT J, LINK H. Multiple sclerosis: a study of chemokine receptors and regulatory T cells in relation to MRI variables. *Eur J Neurol* 2003; **10**: 529–535.
- [38] RAMSDELL F. Foxp3 and natural regulatory T cells: Key to a cell lineage? *Immunity* 2003; **19**: 165–168.
- [39] RAMSDELL F, ZIEGLER SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**: 718–724.
- [40] SCHUBERT LA, JEFFERY E, ZHANG Y, RAMSDELL F, ZIEGLER SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37672–37679.
- [41] SU L, CREUSOT RJ, CHAN SM, UTZ PJ, FATHMAN CG, ERMANN J. Murine CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells fail to undergo chromatin remodeling across the proximal promoter region of the IL-2 gene. *J Immunol* 2004; **173**: 4994–5001.
- [42] TAAMS LS, VUKAMANOVIC-STEJIC M, SMITH J, DUNNE PJ, FLETCHER JM, PLUNKETT FJ, EBELING SB, LOMBARDI G, RUSTIN MH, BIJLSMA JWJ, LAFEVER FPJG, SALMON M, AKBAR AN. Antigen-specific cell suppression by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 1621–1630.

- [43] THORNTON AM, SHEVACH EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; **164**: 183–190.
- [44] VIGLIETTA V, BAECHER – ALLAN C, WEINER HL, HAFLER DA. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; **199**: 971 – 979.
- [45] WALKER MR, CARSON BD, NEPOM GT, ZIEGLER SF, BUCKNER JH: De novo generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells. *Proc Natl Acad Sci* 2005; **102**: 4103–4108.
- [46] WALKER MR, KASPROWICZ DJ, GERSUK VH, BČNARD A, VAN LANDEGHEN M, BUCKNER JH, ZIEGLER SF. Induction of FoxP3 and aquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1437–1443.
- [47] WILDIN RS, FREITAS A. IPEX and FOXP3: clinical and research perspectives. *J Autoimmun* 2005; **25**: 56–62.
- [48] WU AJ, HUA H, MUNSON SH, McDEVITT HO. Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell levels in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 12287–12292.
- [49] YAGI H, NOMURA T, NAKAMURA K, YAMAZAKI S, KITAWAKI T, HORI S, MAEDA M, ONODERA M, UCHIYAMA T, FUJII S, SAKAGUCHI S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; **16**: 1643–1656.
- [50] YOU S, BELGHITH M, COBBOLD S, ALYANAKIAN MA, GOUARIN C, BARRIOT S, GARCIA C, WALDMANN H, BACH JF, CHATENAUD L. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes* 2005; **54**: 1415–1422.
- [51] ZHENG SG, GRAY JD, OHTSUKA K, YAMAGIWA S, HORWITZ DA. Generation *ex vivo* of TGF- $\beta$ -producing regulatory T cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> precursors. *J Immunol* 2002; **169**: 4183–4189.

*Redaktor prowadzący – Barbara Płytycz*

*Otrzymano: 20.02. 2006 r.*

*Przyjęto: 01.03. 2006 r.*

*Katedra Histologii i Immunologii AM*

*80210 Gdańsk, ul.Dębinki 1*

*e-mail: akinomab@amg.gda.pl*