

# **Wybrane mechanizmy działania ludzkich komórek regulatorowych i możliwości ich modulacji**

Rozprawa na stopień doktora habilitowanego nauk medycznych

Dr med. Piotr Trzonkowski  
Katedra Histologii i Immunologii  
Akademia Medyczna w Gdańsku

**GDAŃSK 2006**

# Wybrane mechanizmy działania ludzkich komórek regulatorowych i możliwości ich modulacji

Rozprawa na stopień doktora habilitowanego nauk medycznych

Dr med. Piotr Trzonkowski  
Katedra Histologii i Immunologii  
Akademia Medyczna w Gdańsku

WSTĘP.....	1
1. Limfocyty regulatorowe T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ).....	1
2. Limfocyty supresyjne T CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (T <sub>s</sub> ).....	6
CELE PRACY.....	9
WYNIKI.....	10
1. Regulatorowe limfocyty T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ) w patogenezie choroby Przeszczep przeciw Gospodarzowi (Med Oncol. 2004;21(1):81-94).....	10
2. Hamowanie aktywności cytotoksycznej przez ludzkie regulatorowe limfocyty T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ) (Clin Immunol. 2004;112(3):258-67).....	10
3. Akumulacja ludzkich regulatorowych limfocytów T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (T <sub>reg</sub> ) jako element ryzyka dla zdrowia (Clin Immunol. 2006; 119(3):307-316).....	11
4. Regulacja aktywności supresorowych limfocytów T CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (T <sub>s</sub> ) (Mech Ageing Dev. 2002;123(9):1283-9).....	11
5. Rola terapii rekombinowaną ludzką erytropoetyną na aktywność i poziom supresorowych limfocytów T CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> (T <sub>s</sub> ) (Nephrol Dial Transplant. 2002;17(6):1070-80; Nephrol Dial Transplant. 2005;20(2):367-76).....	12
WNIOSKI.....	14
ZAŁĄCZONE PRACE.....	16
BIBLIOGRAFIA.....	17

Lista często używanych skrótów: APC – komórki prezentujące antygen, DC – komórki dendrytyczne; GvHD – Choroba Przeszczep przeciw Gospodarzowi; IFN – interferon, IL- interleukina; PBSC – komórki macierzyste krwi obwodowej; Rh-Epo – rekombinowana ludzka erytropoetyna; TNF – czynnik martwicy guza; T<sub>reg</sub> – regulatorowe limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>; T<sub>s</sub> – supresorowe limfocyty T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>;

## WSTĘP

Tolerancja immunologiczna może być zdefiniowana jako brak odpowiedzi układu immunologicznego na ściśle zdefiniowany antygen bądź antygeny bez potrzeby stosowania leków immunosupresyjnych (Wood KJ 2003). Modele zwierzęce, w których udało się wyidukować stan immunosupresji znane są od lat pięćdziesiątych XX wieku (Owen RD 1945; Billingham RE 1953). W latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych udowodniono, że za indukcję tolerancji immunologicznej odpowiadają limfocyty T, które zostały nazwane limfocytami regulatorowymi (Gershon RK 1970; Gershon RK 1971; Fujimoto S 1975; North RJ 1984). W 1995 roku opisano po raz pierwszy fenotyp regulatorowych limfocytów T jako  $CD4^+CD25^+$  ( $T_{reg}$ ) (Sakaguchi S 1995). Wkrótce okazało się, że także wśród limfocytów T  $CD8^+$  istnieje podobna grupa komórek regulatorowych, tzw. supresyjne limfocyty T  $CD8^+CD28^-$  ( $T_s$ ) (Jiang S 1998). Świadomość istnienia tych komórek oraz możliwość ich ilościowej oceny pozwoliły rzucić znacznie więcej światła na mechanizmy leżące u podstaw kontroli odpowiedzi immunologicznej i jej zmian w przebiegu ontogenezy człowieka. Ogromny potencjał immunosupresyjny tych dwóch populacji limfocytów wzbudził duże zainteresowanie jako potencjalne narzędzie terapeutyczne w chorobach autoimmunologicznych oraz w indukcji tolerancji immunologicznej po przeszczepach allogenicznych.

### 1. Limfocyty regulatorowe T $CD4^+CD25^+$ ( $T_{reg}$ )

W toku intensywnych badań trwających przez ostatnie lata ustalono, że limfocyty pełniące funkcje regulacyjne posiadają fenotyp:  $CD3^+CD4^+CD25^{high^+}CD152^+CD45RB^-FOXP3^+$ . Od dawna istniały spekulacje, że takie komórki istnieją, ale dopiero rozwój nowoczesnych technik biologii komórkowej umożliwił ich identyfikację. Komórki nazywane regulatorowymi limfocytami T  $CD4^+CD25^+$  lub w skrócie  $T_{reg}$  zostały po raz pierwszy opisane w 1995 roku jako populacja o ogromnym potencjale hamującym reakcje cytotoksyczne w układzie limfatycznym u myszy (Sakaguchi S 1995). Komórki  $T_{reg}$  stanowią nie więcej niż kilka procent wśród limfocytów  $CD4^+$  we krwi obwodowej, śledzionie i węzłach chłonnych. Nieco większy odsetek komórek  $T_{reg}$  występuje w szpiku kostnym (nawet około 30%) (Hoffmann P 2002). Początkowo opisywano je jako limfocyty wywodzące się z limfopoety wewnątrzgrasiczej, gdzie mimo swoich właściwości autoreaktywnych nie są eliminowane (Itoh M 1999; Yamagiwa S 2001). Z grasicy wywędrują tylko te, które mają

ograniczony potencjał proliferacyjny, rozpoznają, ale nie prezentują własnych antygenów oraz mają duże zdolności do recykulacji. Dzięki tym właściwościom komórki  $T_{reg}$  uzupełniają w obwodowych narządach limfatycznych procesy selekcji pozytywnej i negatywnej zachodzące w grasicy. Tworzą główny mechanizm wzmacniający tolerancję immunologiczną w systemie odporności swoistej wśród limfocytów, które są immunokompetentne i nabyły już zdolność do rozpoznawania antygeny. Obecnie wiadomo, że są to tzw. naturalne komórki  $T_{reg}$  (Schwartz RH 2005).

Obok naturalnych komórek  $T_{reg}$  ważną rolę odgrywają tzw. indukowane  $T_{reg}$ . Jest to niewielka pula komórek  $T CD4^+$  przekształcająca się z dojrzałych limfocytów T w komórki  $T_{reg}$  w trakcie odpowiedzi pod wpływem kooperacji z komórkami prezentującymi antygen (APC) w obwodowych narządach limfatycznych (Karim M 2004). Istotną cechą tych komórek jest fakt posiadania przez nie swoistości w stosunku do antygeny, który je wyeliminował, co nie jest tak oczywiste w przypadku puli naturalnych komórek  $T_{reg}$  generowanych w grasicy (Gavin M 2003; Bluestone JA 2005; Suffia IJ 2006). Swoistość w stosunku do ściśle określonego antygeny jest przyczyną, dla której indukowane komórki  $T_{reg}$  są ostatnio intensywnie badane pod kątem ewentualnej terapii w chorobach autoimmunologicznych i przeszczepach allogenicznych. Do tej pory odkryto co najmniej kilka różnych populacji indukowanych komórek  $T_{reg}$  (Suci-Foca N 2003).

Działanie komórek regulatorowych opiera się na kilku pozornych paradoksach. Pomimo fenotypu pobudzonych limfocytów, komórki  $T_{reg}$  są wysoce anergiczne. Wymagają pobudzenia, aby rozpocząć proces supresji odpowiedzi immunologicznej. Pomimo posiadania receptorów podobnych lub takich samych jak komórki efektorowe, hamują one silnie reakcje odpornościowe. Jednym z ostatnich odkryć dotyczących biologii komórek  $T_{reg}$  jest identyfikacja czynnika transkrypcyjnego FOXP3, który jest obecnie uznawany za najbardziej specyficzny marker komórek  $T_{reg}$  (Fontenot JD 2005). Mimo to, wciąż „złotym standardem” w ocenie komórek regulatorowych pozostają testy funkcjonalne, w których konieczne jest wykazanie supresji proliferacji lub funkcji komórek efektorowych, aby ze 100% pewnością można było powiedzieć, że badane komórki można zaliczyć do komórek  $T_{reg}$  (Wood KJ 2003). We krwi obwodowej i tkankach, dzięki silnym właściwościom supresorowym, komórki  $T_{reg}$  sprawują kontrolę nad reakcjami immunologicznymi w trakcie pobudzenia układu odpornościowego. W miejscu reakcji zapalnej interferują z efektorowymi limfocytami  $T CD4^+CD25^-$  oraz  $CD8^+$ , hamując ich aktywność (Piccirillo CA 2001). Dopiero niedawno opisano możliwość regulacji przez komórki  $T_{reg}$  odpowiedzi cytotoksycznych limfocytów T

CD8<sup>+</sup> (CTL) oraz NK na alloantygeny ((Piccirillo CA 2001; Trzonkowski P 2004). Dzięki temu nie dochodzi do nadmiernego uszkodzenia tkanek gospodarza i uwalniania z nich autoantygenów, mogących doprowadzić do wykształcenia patologicznych klonów autoreaktywnych, które uszkadzałyby własne tkanki (Sakaguchi S 1995; Sakaguchi S 2000). Wzajemny kontakt T<sub>reg</sub> z innymi limfocytami znacznie zmniejsza zdolność tych ostatnich do proliferacji i różnicowania się do komórek efektorowych i pamięci (Salomon B 2000; Piccirillo CA 2001). Z kolei komórki T<sub>reg</sub> po pobudzeniu antygenem proliferują w małym stopniu i są najprawdopodobniej terminalnie zróżnicowane, aczkolwiek ich podatność na apoptozę pozostaje dyskusyjna (Taams LS 2001; Banz A 2002). Wydaje się jednak, że nie ulegają one delecji klonalnej w obwodowych narządach limfatycznych pełniąc stale, jako dojrzałe komórki, swoje funkcje regulatorowe (Papiernik M 1997). Dzięki szybkiej migracji do miejsc, w których doszło do procesu zapalnego i uszkodzenia tkanek gospodarza (o każdej etiologii: infekcyjnej, autoimmunologicznej, alergicznej, nowotworowej, etc.) odpowiedź immunologiczna nie rozwija się w sposób nadmierny (Sakaguchi S 1995). Konsekwencją tego jest ograniczanie istniejącego stanu zapalnego. Nie dochodzi więc do uszkodzenia tkanek na drodze autoagresji. Ten mechanizm hamowania jest zależny od wzajemnego kontaktu T<sub>reg</sub> z innymi komórkami oraz wydzielanych cytokin. Podobne mechanizmy mają miejsce także podczas regulowania odpowiedzi w stosunku do alloantygenów po przeszczepie, co nosi nazwę indukcji tolerancji immunologicznej (Wood KJ 2003). Niemniej jednak reakcja nie ma wyłącznie charakteru lokalnego – komórki T<sub>reg</sub> migrują także do narządów limfatycznych drenujących okolicę procesu zapalnego i również w lokalnych węzłach i grudkach hamują rozpoznawanie auto- i alloantygenów na komórkach dendrytycznych (Iellem A 2001).

Ważnym uściśleniem dotyczącym fenotypu komórek T<sub>reg</sub> jest fakt, iż nie wszystkie komórki o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, a jedynie ich mała grupa wykazująca wysoką ekspresję tego antygeny (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) należy do komórek T<sub>reg</sub> (Baecher-Allan C 2001). Niezależnie od pochodzenia dojrzałe limfocyty T<sub>reg</sub> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nie wykazują ekspresji antygeny charakterystycznego dla komórek efektorowych, CD45RB (Annacker O 2000; Taams LS 2001), natomiast posiadają w cytoplazmie komórek spoczynkowych, a na błonie komórkowej komórek aktywowanych receptor limfocytów aktywowanych CD152 (CTLA-4 – Cytotoxic T lymphocyte antigen - 4). Rola tego receptora jest bardzo ciekawa, ponieważ jest on związany z hamowaniem odpowiedzi immunologicznej w różny sposób, w zależności od komórki wykazującej jego ekspresję. CD152 jest obecny w małych ilościach w populacjach limfocytów efektorowych, a jego rola polega tam na hamowaniu praktycznie wszystkich

funkcji komórki po połączeniu receptora CD152 z receptorami z rodziny B7 obecnymi na komórkach APC. Efekt ten jest związany z hamowaniem szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej cząsteczki CD28, która jest odpowiednikiem CD152 o właściwościach aktywujących komórki efektorowe (Takahashi T 2000). Z drugiej strony, komórki  $T_{reg}$  są aktywowane poprzez receptor CD152, aczkolwiek aktywacja ta sprowadza się do wywierania silnego efektu supresyjnego na sąsiednie komórki (Takahashi T 2000). Ekspresja CD152 na limfocytach  $T_{reg}$  jest związana z ich kooperacją z komórkami APC, głównie komórkami dendrytycznymi (DC). Okazuje się, że nawet mały odsetek komórek  $T_{reg}$  obecny w naszym organizmie jest w stanie oddziaływać na odpowiedź immunologiczną w znaczący sposób ze względu na silne powinowactwo receptora CD152 do cząsteczek B7. Powinowactwo to jest około 20-krotnie wyższe od powinowactwa odpowiednika tego receptora na limfocytach efektorowych, receptora CD28 (Linsley PS 1992). Ważną konsekwencją interakcji komórek  $T_{reg}$  z DC poprzez parę CD152-B7 jest indukcja ekspresji enzymu 2,3-dioksygenazy indoloaminy (IDO) w komórkach DC (Grohmann U 2003). IDO zmienia szlak metabolizmu tryptofanu na kinureninowy, co powoduje deficyt tego aminokwasu i znacząco przyczynia się do supresji odpowiedzi immunologicznej (Mellor AL 2004; Munn DH 2004). Wydaje się obecnie, że ten stosunkowo niedawno opisany mechanizm oddziaływania komórek  $T_{reg}$  z DC będzie jedną z głównych osi badań nad tolerancją w ciągu najbliższych lat (Mellor AL 2004). Na uwagę zasługuje fakt, iż receptor CD152 występuje i najprawdopodobniej spełnia podobną rolę na supresorowych komórkach  $CD8^+$  opisywanych w dalszej części tej pracy (Miller SD 1995).

Lista receptorów, których ekspresja jest postulowana w literaturze jako znacząca w działaniu komórek regulatorowych, stale się powiększa. Stosunkowo niedawno potwierdzono, że znajdujący się na błonie komórkowej indukowany glukokorykoidami receptor dla TNF (glucocorticoid Induced Tumour Necrosis Factor Receptor - GITR) najprawdopodobniej odgrywa rolę w hamowaniu funkcji komórek regulatorowych (Ji HB 2004). Wynika to z prac przeprowadzonych na modelach zwierzęcych gdzie nadekspresja GITR na komórkach  $T_{reg}$  prowadziła do zaostrzenia chorób autoimmunologicznych (Patel M 2005). Niedawno odkryte różnice w aktywności komórek  $T_{reg}$  w zależności od ekspresji receptora CD62L sugerują znaczenie cyrkulacji tych komórek poprzez obwodowe narządy limfatyczne, jako że selektyna CD62L jest jednym z najważniejszych receptorów pozwalających na taką cyrkulację (Fu S et al. 2004). Znaczenie w działaniu komórek  $T_{reg}$  mają także izoformy CD44 (Firan M 2006),

CD27 (Koenen HJ 2005), CD103 (Suffia I 2005), ICAM-1 (Kohm AP 2003), a także wiele innych receptorów (BD Bioscience 2005).

Ilość receptorów, która jest postulowana jako ważna dla funkcjonowania komórek  $T_{reg}$  wyraźnie sugeruje, że działanie tych komórek w głównej mierze zależy od kontaktów międzykomórkowych. Niemniej jednak, w aktywności immunosupresyjnej komórek  $T_{reg}$  ważną rolę odgrywają także cytokiny. Otóż wykazano, że stymulacja przy pomocy interleukiny 10 (IL10) znacznie zwiększa supresorowe własności komórek  $T_{reg}$  (Asseman C 1999; Yamagiwa S 2001). Przynajmniej część tego efektu zależy od samych komórek  $T_{reg}$ , ponieważ mają one zdolność do syntezy tej cytokiny (Yamagiwa S 2001). Mogą być one utożsamiane ze znanymi od kilku lat komórkami TH3 lub Tr1 (Kitani A 2000). Zależne od IL10 komórki Tr1 jako pierwsze znalazły swoje miejsce w badaniach klinicznych na ludziach (Battaglia M 2006). Drugą ważną cytokiną o właściwościach immunosupresyjnych produkowaną przez komórki  $T_{reg}$  jest transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Huang X 2005). Niemniej jednak przynajmniej część efektów związanych z działaniem tej cytokiny wymaga oddziaływań międzykomórkowych poprzez CD152 (Zheng SG 2006) lub obecności błonowej formy tej cytokiny, co upodabnia ją funkcjonalnie do receptora powierzchniowego (Ghiringhelli F 2005). Podwyższona aktywność limfocytów  $T_{reg}$   $CD4^+CD25^+$  ma również związek z gospodarką IL2. Cytokiny ta jest ważna dla generowania tych komórek, ale z drugiej strony komórki  $T_{reg}$  potrafią działać w mechanizmie sprzężenia zwrotnego hamując produkcję IL2 przez komórki pomocnicze Th  $CD4^+$  (Piccirillo CA 2001; Hoffmann P 2004). Bez wątpienia deficyt IL2 skutkuje także zmniejszoną aktywnością cytotoksyczną limfocytów T  $CD3^+CD8^{high+}$ , ważnych efektorów odpowiedzi immunologicznej. Niemniej jednak także tutaj ważny jest kontakt między komórkami. Komórki  $T_{reg}$  hamują IL2-zależną aktywność cytotoksyczną limfocytów T  $CD3^+CD8^{high+}$ , głównie w bezpośrednim kontakcie z nimi (Piccirillo CA 2001).

Aktywność komórek  $T_{reg}$  koreluje z wystąpieniem wielu chorób. Wiadomo, że brak tych komórek u ludzi jest związany z ciężkim autoimmunologicznym zespołem IPEX (IPEX – Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome) (Bennett CL 2001). Niski poziom komórek  $T_{reg}$  koreluje np. z nietolerancją na antygeny pokarmowe oraz z rozwojem cukrzycy typu I i wielu innych chorób autoimmunologicznych (Kukreja A 2002; Karlsson MR 2004). Z drugiej strony, lokalna lub systemowa akumulacja tych komórek sprzyja supresji odpowiedzi immunologicznej i może doprowadzić do rozwoju przewlekłych infekcji i stanów zapalnych (Belkaid Y 2002; Miyara M 2006), a także do szybszego

przerzutowania w chorobach nowotworowych (Ghiringhelli F 2005; Chattopadhyay S 2006; Smyth MJ 2006). Znane z literatury dotychczasowe próby stosowania komórek  $T_{reg}$  w eksperymentalnych modelach terapii adoptywnych u zwierząt również potwierdzają dużą użyteczność tych komórek. Pozbawienie materiału przeszczepowego komórek  $T_{reg}$  znacznie zwiększało ciężkość i ryzyko wystąpienia choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (GvHD), podczas gdy zwiększenie ich odsetka w podawanej puli obwodowych komórek macierzystych (PBSC) znacznie poprawiało wyniki profilaktyki i leczenia GvHD (Cohen JL 2002; Taylor PA 2002). GvHD będzie prawdopodobnie pierwszą chorobą, w której sztucznie namnożone komórki  $T_{reg}$  znajdą zastosowanie kliniczne – w tej chwili rozpoczyna się już pierwsza faza badania klinicznego z ich użyciem we Włoszech (Battaglia M 2006). W bardzo bliskiej perspektywie model ten zostanie też przeniesiony do leczenia cukrzycy typu I (Bluestone JA 2005) i indukcji tolerancji przeszczepów organów (Wood KJ 2003), a w dalszej perspektywie do leczenia ciężkich postaci innych chorób, u podłoża których leży autoagresja. Silne właściwości immunosupresyjne komórek  $T_{reg}$  mogą mieć negatywny wpływ na zdrowie człowieka. Nadmiar tych komórek koreluje z progresją nowotworów i przewlekłymi infekcjami (Belkaid Y 2005; Ghiringhelli F 2005; Miyara M 2006; Smyth MJ 2006). W naszych własnych badaniach stwierdziliśmy, że ilość tych komórek koreluje z brakiem odpowiedzi na szczepienie przeciw grypie (Trzonkowski P 2003).

## **2. Limfocyty supresyjne T $CD8^+CD28^-$ ( $T_s$ )**

Wkrótce po odkryciu komórek  $T_{reg}$  okazało się, że także wśród limfocytów T  $CD8^+$  istnieje podobna grupa komórek regulatorowych, tzw. supresyjne limfocyty T  $CD8^+CD28^-$  ( $T_s$ ), aczkolwiek ich supresorowa funkcja była bardzo długo dyskusyjna. Pierwszy mocny dowód na ich aktywną rolę w regulacji tolerancji immunologicznej został opublikowany przez zespół Suci-Focca. Udowodnili oni, że komórki te są zdolne do silnego hamowania odpowiedzi na alloantygeny w ludzkim modelu *in vitro*, a także w zwierzęcym modelu *in vivo* (Jiang S 1998).

Supresyjne możliwości limfocytów T o fenotypie  $CD8^+CD28^-$  są znane od dawna. Akumulacja komórek T  $CD8^+CD28^-$  u ludzi starszych została opisana po raz pierwszy na początku lat 90-tych XX wieku przez grupę Effros (Perillo NL 1993; Effros RB 1994). W ciągu kolejnej dekady komórki te zyskały opinię „biernych”, tzn. komórek zajmujących przestrzeń w układzie immunologicznym (immune space”) bez wyraźnej funkcji (Grubeck-



Loebenstein B 1997; Franceschi C 1999). Charakteryzuje je długowieczność nazywana też replikacyjną starością („replicative senescence”), tzn. limfocyty te są odporne na apoptozę, terminalnie zróżnicowane i tracą zdolność do podziałów komórkowych (Spaulding C 1999; Effros RB 2000). Cechami, które przemawiają za ich regulatorową funkcją, są ich oligoklonalność oraz anergia w odpowiedzi na stymulację (Boucher N 1998; Iezzi G 1998; Myśliwska J 1999). Ich supresyjne właściwości w połączeniu z wyraźną akumulacją u osób starszych mogą być odpowiedzialne za osłabioną odporność w tym przedziale wiekowym (potwierdziły to także nasze prace) (Saurwein-Teissl M 2002; Trzonkowski P (b) 2003).

Fenotyp komórek  $T_s$  w dużej mierze pokrywa się z opisywanymi powyżej komórkami  $T_{reg}$ , a ich działanie jest powiązane z niektórymi subpopulacjami komórek  $T_{reg}$ , głównie  $Tr1$ . Najpełniejszy fenotyp Komórek  $T_s$  to  $CD3^+CD8^+CD28^-CD152^+CD62L^+FOXP3^+$ . Ich bezpośredni mechanizm działania polega głównie na wpływie na komórki APC, które w kontakcie z  $T_s$  doprowadzają do wytworzenia tolerancji na określone antygeny przez komórki efektorowe (Scotto L 2004 ). Kontakt komórek  $T_s$  z APC powoduje na powierzchni tych ostatnich spadek ekspresji receptorów z rodziny B7 i CD40 - ważnych elementów synapsy immunologicznej (Li J 1999; Colovai AI 2000). Kluczową rolę w transformacji komórek APC w „tolerogenne komórki APC” w kontakcie z  $T_s$  miałyby odgrywać - wtórne do powyższych zmian w ekspresji receptorów - zwiększenie ekspresji immunoglobulinopodobnych transkryptów 3 i 4 [“ Immunoglobulin-like transcript 3” i “4” (ILT3) i (ILT4)] w komórkach APC, głównie w subpopulacji komórek dendrytycznych (Chang CC 2002; Kim-Schulze S 2006). Powstałe w ten sposób „tolerogenne komórki APC” miałyby zdolność indukowania w limfocytach T  $CD4^+$  efektorowych fenotypu komórek regulatorowych  $T_{reg}$   $CD4^+CD25^+$ . Ten skomplikowany łańcuch interakcji międzykomórkowych, począwszy od komórek  $T_s$ , poprzez indukcję „tolerogennych komórek APC” do zmiany limfocytów T  $CD4^+$  efektorowych w komórki regulatorowe  $T_{reg}$   $CD4^+CD25^+$  łączy w sobie kilka zjawisk, które były opisywane uprzednio w literaturze. Chodzi tu przede wszystkim o możliwość generowania komórek supresorowych poza grasicą (Suciu-Foca N 2003; Karim M 2004; Battaglia M 2006) oraz mechanizm „zakaźnej tolerancji” („infectious tolerance”) polegający na możliwości „zainfekowania” komórki efektorowej właściwościami supresorowymi przez istniejącą już komórkę supresorową (Waldmann H 1998). Wielu autorów postuluje, iż centralną rolę w obu tych zjawiskach odgrywają właśnie komórki APC, głównie komórki dendrytyczne (DC) (Mellor AL 2004). Ostatnio wykazano, że zwiększony odsetek pewnych subpopulacji komórek DC, które w

modelach zwierzęcych były związane z tolerancją, występuje również u ludzi po przeszczepach. U biorców przeszczepu wątroby i jelita stwierdzono wysoki odsetek komórek DC z ekspresją ILT3 i ILT4 (Sindhi R 2005), natomiast u biorców wątroby (Mazariegos GV 2003) lub nerki (Trzonkowski P 2005) stwierdzono wysokie odsetki plazmacytoidowych komórek DC. We wszystkich przypadkach wysoki odsetek tych komórek korelował z możliwością podawania zmniejszonej dawki leków immunosupresyjnych. Wydaje się więc, że komórki  $T_s$  wymagają dla ukierunkowanego działania supresyjnego skomplikowanej sieci interakcji międzykomórkowych (Suci-Foca N 2003). Gdy jakiegokolwiek ogniwo w tym łańcuchu interakcji zawodzi, komórki te stają się niczym więcej jak tylko rozrosłymi klonami wypełniającymi przestrzeń immunologiczną (Ku CC 2001). Być może, utrzymywanie stałej ilości komórek układu immunologicznego w organizmie na drodze proliferacji homeostatycznej jest kolejną funkcją komórek  $T_s$  (Ku CC 2001; Trzonkowski P (b) 2003; Zhang H 2005). Wydaje się, że limfocyty  $T$   $CD8^+$  po osiągnięciu określonej ilości podziałów komórkowych przestają się dzielić, różnicują się do fenotypu  $CD8^+CD28^-$  i zaczynają hamować podziały innych komórek utrzymując tym samym ilość limfocytów w organizmie na ściśle określonym poziomie (Wills MR 2002). Ważną rolę w tym procesie mogłaby spełniać nasilona sekrecja cytokin pozapalnych przez komórki  $T_s$ , głównie  $IFN\gamma$  i  $TNF\alpha$ , które znane są z hamowania proliferacji na korzyść różnicowania limfocytów (Eylar EH 2001). Także fakt, że komórki  $T_s$  bytują we wszystkich obwodowych narządach limfatycznych i rozwijają się na zasadzie limfopojezy zewnątrzgraniczej mógłby ułatwiać im kontrolę nad proliferacją innych populacji w układzie immunologicznym (Azuma M 1993; Gorochoff G 1994).

Niemniej jednak, wciąż zbyt mało wiemy o komórkach  $T_s$ . Śledzenie ich ekspansji przypomina nieco lekturę książki „Dr. Jeckyll and Mr. Hyde”. Okazuje się bowiem, że namnożone w warunkach leukopenii komórki  $CD8^+CD28^-$  tracą zupełnie swoje supresyjne właściwości i stają się silnym induktorem odpowiedzi immunologicznej. O ich sile może świadczyć fakt, że potrafią indukować reakcję odrzucenia przeszczepu znacznie silniej aniżeli powstające w warunkach normopenii limfocyty alloreaktywne (Wu Z 2004).

**Poniższy zbiór sześciu prac oryginalnych stanowi próbę opisu niektórych funkcji komórek regulatorowych oraz ich roli w fizjologii i patologii człowieka.**

## **CELE PRACY**

- ❑ Opis mechanizmu immunosupresyjnego wpływu regulatorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) na aktywność cytotoksyczną ludzkich limfocytów pochodzących od zdrowych dawców oraz pacjentów z GvHD.
- ❑ Określenie związku między ilością komórek T<sub>reg</sub> w organizmie a stanem komórkowej odpowiedzi immunologicznej (populacje cytotoksyczne) – korelacja ze stanem zdrowia.
- ❑ Wyjaśnienie wpływu związanego z wiekiem niedoboru IL2 na ekspresję immunosupresyjnego receptora CD152 na supresorowych limfocytach T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (T<sub>s</sub>).
- ❑ Możliwości modulacji ilości regulatorowych komórek w warunkach klinicznych:
  - komórek T<sub>reg</sub> u pacjentów po przeszczepie obwodowych komórek macierzystych (PBSC) z powodu rozrostowych chorób krwi
  - komórek T<sub>s</sub> u pacjentów hemodializowanych z powodu przewlekłej niewydolności nerek w trakcie leczenia ludzką rekombinowaną erytropoetyną (Rh-Epo),

## WYNIKI

### 1. Regulatorowe limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) w patogenezie choroby Przeszczep przeciw Gospodarzowi (Med Oncol. 2004;21(1):81-94)

W roku 2002 zakończyliśmy badanie nad rolą komórek T<sub>reg</sub> w patogenezie choroby Przeszczep przeciw Gospodarzowi (GvHD) u pacjentów po przeszczepie obwodowych komórek macierzystych (PBSC) z powodu rozrostowych chorób krwi. Okazało się, że biorcy, którzy otrzymali mało komórek T<sub>reg</sub> w materiale przeszczepowym rozwijali ostrą formę GvHD, podczas gdy infuzja większej ilości tych komórek chroniła przed chorobą. Co więcej, już liczba komórek T<sub>reg</sub> we krwi obwodowej dawcy korelowała z ryzykiem rozwoju ostrej formy GvHD u biorcy. W badaniu tym zainteresowała nas także korelacja między wysoką aktywnością komórek T<sub>reg</sub>, a niską aktywnością cytotoksyczną komórek NK biorców. Wydawało się, że wysoki poziom komórek T<sub>reg</sub> korelował z niską aktywnością NK tylko wtedy, gdy jednocześnie notowaliśmy niskie poziomy IL2. Świadczyłoby to o zależności, w której komórki T<sub>reg</sub> obniżałyby ilość IL2 niezbędną do stymulacji komórek NK. Konsekwencją hamowania sekrecji IL2 była niska aktywność NK oraz ochrona przed GvHD. Zależność tę zbadaliśmy dokładniej w modelu *in vitro* z wykorzystaniem limfocytów zdrowych ochotników w kolejnej pracy.

### 2. Hamowanie aktywności cytotoksycznej przez ludzkie regulatorowe limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) (Clin Immunol. 2004;112(3):258-67)

W celu potwierdzenia naszych obserwacji dotyczących roli ludzkich komórek T<sub>reg</sub> w GvHD stworzyliśmy model *in vitro*, w którym wykazaliśmy, iż komórki te hamują aktywność cytotoksyczną limfocytów T CD8<sup>+</sup> oraz komórek NK od zdrowych dawców. W modelu tym udało się nam ustalić, iż główny mechanizm, który jest odpowiedzialny za tą immunosupresję to bezpośrednie oddziaływania międzykomórkowe. Drugoplanową rolę mógł też odgrywać fakt, iż komórki T<sub>reg</sub> nie produkowały IL2, a także hamowały jej sekrecję przez komórki pomocnicze Th. O ile wpływ komórek T<sub>reg</sub> na limfocyty T CD8<sup>+</sup> był już wcześniej podejrzewany (Piccirillo CA 2001), to ich supresyjne działanie na komórki NK zostało opisane po raz pierwszy w naszej pracy. Niestety, było to też powodem dużego opóźnienia w publikacji wyników ze względu na duże niedowierzanie recenzentów i częste negatywne recenzje naszej pracy. Słuszność naszej koncepcji została niedawno potwierdzona przez

francuską grupę badaczy cytujących naszą pracę. Uzyskali oni podobne wyniki analizując odporność w chorobach onkologicznych (Ghiringhelli F 2005). Także inni autorzy znaleźli podobną korelację (Chattopadhyay S 2006; Smyth MJ 2006).

### **3. Akumulacja ludzkich regulatorowych limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) jako element ryzyka dla zdrowia (Clin Immunol. 2006; 119(3):307-316)**

W kolejnej pracy prześledziliśmy, jaki wpływ na zdrowie może mieć akumulacja komórek T<sub>reg</sub> w organizmie. Przeanalizowaliśmy grupę młodych i seniorów pod kątem stanu zdrowia i ilości komórek T<sub>reg</sub>. Stwierdziliśmy korelację między wzrastającą ilością tych komórek we krwi obwodowej i pogarszającym się stanem zdrowia. Dodatkowo, stwierdziliśmy upośledzenie procesu apoptozy komórek T<sub>reg</sub> u osób z zaburzeniami zdrowotnymi, szczególnie u osób starszych, co dodatkowo sprzyjało akumulacji komórek T<sub>reg</sub>. Konsekwencją podwyższonej ilości komórek T<sub>reg</sub> była osłabiona odpowiedź komórkowa u osób charakteryzujących się złym stanem zdrowia, zarówno w zakresie odporności swoistej mediowanej przez limfocyty T CD8<sup>+</sup>, jak i odporności wrodzonej mediowanej przez komórki NK. Dodatkowo stwierdziliśmy, że wysoki poziom komórek T<sub>reg</sub> korelował z obniżoną produkcją IL2 przez limfocyty T CD4<sup>+</sup> efektorowe. Dwa efekty – niska aktywność komórek NK i niskie poziomy IL2 są powszechnie znanymi zjawiskami towarzyszącymi pogarszającemu się stanowi zdrowia u osób w wieku podeszłym, które jak dotąd nie były zadowalająco wyjaśnione. Stąd, odkrycie iż akumulacja komórek T<sub>reg</sub> może być jedną z ważnych przyczyn tego stanu rzeczy wydaje się ważnym poszerzeniem wiedzy na ten temat.

### **4. Regulacja aktywności supresorowych limfocytów T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (T<sub>s</sub>) (Mech Ageing Dev. 2002;123(9):1283-9)**

Jak wspomniano we wstępie, supresyjne właściwości limfocytów T CD8<sup>+</sup> sugerowały już prace Effros, natomiast potwierdziła to dopiero Succiu-Focca. Niemniej jednak, już wcześniej prace grupy Blustone'a sugerowały, iż manipulacja niektórymi receptorami limfocytów T CD8<sup>+</sup> może doprowadzić do wyidukowania tolerancji immunologicznej (Miller SD 1995). Grupa ta opisała możliwość indukcji tolerancji immunologicznej poprzez modulowanie interakcji stymulującego receptora CD28 lub przeciwnie do niego działającego supresyjnego CTLA-4 (CD152) z receptorami z rodziny B7 w obrębie synapsy immunologicznej (Miller SD 1995). Od dawna wiadomo, że jednym z głównych zadań tych

receptorów jest regulacja sekrecji IL2, jednej z najważniejszych cytokin w układzie immunologicznym. Okazuje się, że IL2 jest także ważna w procesach regulacji i supresji odpowiedzi immunologicznej (Boden E 2003; Maloy KJ 2005). W naszym badaniu analizowaliśmy wpływ związanego z wiekiem niedoboru IL2 na ekspresję receptorów CD28 i CD152 na komórkach  $T_s$ . Jak wcześniej wspomniano, zjawisko spadku produkcji IL2 wraz z wiekiem jest powszechnie znane w gerontologii. Potwierdziliśmy, iż odsetek komórek  $T_s$  we krwi obwodowej rośnie wraz z wiekiem oraz że komórki te tracą wtedy również ekspresję CD152. W części *in vitro* wspomnianej pracy wykazaliśmy, iż spadek ekspresji CD28 jest niezależny od wpływu IL2, podczas gdy ekspresja receptora CD152 na powierzchni limfocytów może być stymulowana poprzez zwiększenie poziomu egzogennej IL2. W konkluzji pracy zawarliśmy hipotezę, iż supresja mediowana przez komórki  $T_s$  jest regulowana poprzez IL2, której poziom zwiększa się podczas odpowiedzi immunologicznej. Pobudza to ekspresję supresyjnego CD152 na  $T_s$  i nie dopuszcza do nadmiernego rozwoju odpowiedzi chroniąc organizm przed możliwymi zjawiskami z autoagresji. Mechanizm ten w wieku podeszłym może zawodzić ze względu na niską produkcję IL2.

Wprawdzie praca nad komórkami  $T_s$  wykonywana była niezależnie od opisanych wyżej badań nad komórkami  $T_{reg}$ , to należy podkreślić, iż IL2 może być przykładem powiązań w układzie immunologicznym. Wysoki poziom komórek  $T_{reg}$  opisany powyżej może zmniejszać ilość dostępnej IL2, a tym samym ograniczać aktywność innej populacji regulatorowej, a mianowicie komórek  $T_s$ .

## **5. Rola terapii rekombinowaną ludzką erytropoetyną na aktywność i poziom supresorowych limfocytów $T$ $CD8^+CD28^-$ ( $T_s$ ) (Nephrol Dial Transplant. 2002; 17(6):1070-80; Nephrol Dial Transplant. 2005; 20(2):367-76)**

W kolejnych dwóch pracach prześledziliśmy poziom komórek  $T_s$  u chorych hemodializowanych z powodu przewlekłej niewydolności nerek. Zespół ten został wykorzystany, jako że zaburzenia odporności są tu w dużej mierze wywołane aktywnością prozapalną stymulowaną procesem hemodializy. Do pewnego stopnia odpowiada to podwyższonej aktywności prozapalnej odpowiedzialnej za obniżoną odporność w wieku podeszłym. Z drugiej strony, u chorych z tym zespołem, którzy otrzymywali erytropoetynę obserwowaliśmy w poprzednich badaniach bardzo szybką poprawę w zakresie wykładników odporności immunologicznej (Bryl E 1999). W badaniach wstępnych ustaliliśmy, iż poziom

komórek T<sub>s</sub> u tych pacjentów jest wyjątkowo wysoki. Następnie w trakcie trzech niezależnych badań prospektywnych, z których każde trwało około jednego roku, wykazaliśmy, iż podanie rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny (Rh-Epo) powodowało spadek odsetka komórek T<sub>s</sub> u tych pacjentów. Korelowało to z poprawą badanych wykładników odpowiedzi immunologicznej, głównie spadkiem poziomu cytokin prozapalnych (IL6, TNF $\alpha$ ) oraz immunosupresyjnych (IL10). Ustaliliśmy także, że spadek odsetka komórek T<sub>s</sub> u osób leczonych Rh-Epo jest nie tylko efektem odnowy układu immunologicznego, ale także efektem apoptozy tych komórek mediowanej poprzez receptory dla TNF $\alpha$ . Co ciekawe, Rh-Epo podana do hodowli *in vitro* nie była w stanie indukować apoptozy, co wskazuje na bardziej skomplikowany szlak regulacji ilości komórek T<sub>s</sub> *in vivo* u badanych pacjentów.

## WNIOSKI

- ❑ Regulatorowe limfocyty T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) wywierają efekt supresyjny na cytotoksyczne limfocyty T CD8<sup>+</sup> oraz komórki NK poprzez bezpośrednie oddziaływania międzykomórkowe.
- ❑ Ilość komórek T<sub>reg</sub> we krwi obwodowej pozostaje w związku z wiekiem i stanem zdrowia. Osoby cierpiące z powodu przewlekłych chorób, szczególnie osoby starsze, charakteryzuje akumulacja komórek T<sub>reg</sub>, co koreluje to z osłabioną odpowiedzią komórkową i niskimi poziomami IL2.
- ❑ Możliwy jest wpływ na stan zdrowia poprzez manipulację ilością komórek T<sub>reg</sub>. Ich ilość we krwi obwodowej dawcy, a także ich ilość przetoczona biorcy korelują z wolnym od ostrej formy GvHD przebiegiem leczenia u pacjentów po przeszczepie PBSC.
- ❑ Ilość supresorowych limfocytów T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (T<sub>s</sub>) we krwi obwodowej wzrasta z wiekiem.
- ❑ Ekspresja ważnego funkcjonalnie supresyjnego receptora CD152 na komórkach T<sub>s</sub> jest zależna od IL2 i zmienia się wraz z wiekiem w zależności od poziomu tej cytokiny.
- ❑ Ilość komórek T<sub>s</sub> może być regulowana. U pacjentów hemodializowanych z powodu przewlekłej niewydolności nerek podawanie Rh-Epo powoduje spadek ilości komórek T<sub>s</sub> i jest to zależne od indukowania ich apoptozy na szlaku zależnym od receptorów dla TNF $\alpha$ .

Ogromny postęp w pracach nad komórkami regulatorowymi pozwolił na ustalenie ich roli w prawidłowej odpowiedzi immunologicznej, a także w zaburzeniach tej odpowiedzi. Brak lub nadmiar tych komórek może doprowadzić do wystąpienia cytowanych we wstępie przewlekłych chorób o podłożu infekcyjnym, autoimmunologicznym oraz nowotworów. Również prace będące kanwą niniejszej rozprawy dowodzą istotnej roli tych komórek. W sposób oczywisty w trakcie badań nad tymi komórkami pojawiła się idea wykorzystania ich w terapiach adoptywnych. Uwaga naukowców kieruje się przede wszystkim ku komórkom T<sub>reg</sub>. Podstawową przeszkodą jest bardzo mała ilość tych komórek w organizmie. Wydaje się, że przeszkoda ta została przynajmniej częściowo przewyżczona dzięki możliwościom ekspansji tych komórek *in vitro*. Dobre wyniki osiągnęte są poprzez ich preinkubację z allogenicznymi splenocytami lub/i podanie do hodowli średnich lub dużych dawek IL-2



(Cohen JL 2002). Najbardziej obiecująca jest stymulacja izolowanych komórek przy pomocy kulek („beads”) opłaszczonych przeciwciałami przeciw cząstkom kostymulatorowym – głównie antyCD3 i/lub antyCD28 w obecności dużych dawek IL2 (Godfrey WR 2004; Hoffmann P 2004). Możliwe jest także hodowanie tych komórek na płytkach opłaszczonych tymi przeciwciałami (Trzonkowski – obserwacja własna). Podejście takie zwiększa ilość tych komórek od kilku do kilkunastu tysięcy razy w ciągu dwóch-trzech tygodni. Takie protokoły mają jednak jedną zasadniczą wadę, a mianowicie brak specyficzności namnożonych komórek do określonego antygeny lub wręcz haplotypu w przypadku przeszczepów allogenicznych. Opisane są już pierwsze próby hodowli i namnażania komórek  $T_{reg}$  regulujących odpowiedź jedynie przeciw ściśle określonym antygenom. Jest to osiągnięte poprzez ich stymulację naturalnymi lub sztucznie produkowanymi komórkami APC, które wcześniej są „ładowane” tymże antygenem (Tarbell KV 2004). Należy podkreślić, że konieczność tej specyficzności nie jest definitywnie potwierdzona. Dzieje się tak ze względu na zjawisko biernej regulacji („bystander regulation”), która pozwala komórkom  $T_{reg}$  hamować reakcje odpornościowe wobec antygenów innych niż wnikałoby to z ich specyficzności (Karim M 2005). Z drugiej strony istnieją prace sugerujące, iż selekcja klonów, które są specyficzne wobec ściśle określonych antygenów daje im przewagę nad heterogenną populacją rozmnożoną poprzez niespecyficzną stymulację kombinacją przeciwciał i IL2 (Masteller EL 2006 ; Trenado A 2006 ). Pierwsze próby podawania różnych populacji komórek Treg w GvHD i chorobach autoimmunologicznych u człowieka są już podejmowane, aczkolwiek nie dały one jeszcze żadnych wyników (Battaglia M 2006).

Czerpiąc z doświadczeń wynikających z prezentowanych prac autor niniejszego opracowania rozpoczął pracę nad ekspansją komórek  $T_{reg}$ , które w przypadku sukcesu będziemy chcieli podawać jako rodzaj immunoterapii adoptywnej u dzieci-biorców szpiku lub po przeszczepie komórek macierzystych z ciężką postacią ostrej i/lub przewlekłej GvHD, która nie poddaje się dotychczas stosowanemu farmakologicznemu leczeniu immunosupresyjnemu. Jest to temat rozpoczętego właśnie grantu badawczego przyznanego autorowi niniejszej rozprawy przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji (Trzonkowski P 2006).

## **ZAŁĄCZONE PRACE**

1. Trzonkowski P, Myśliwska J, Szmit E, Żak M, Foerster J, Myśliwski A. Lower percentage of CD8(high+)CD152(+) but not CD8(high+)CD28(+) T lymphocytes in the elderly may be reverted by interleukin 2 in vitro. *Mech Ageing Dev.* 2002;123(9):1283-93. **IF 2.87/ KBN: 10.0**
2. Trzonkowski P, Myśliwska J, Dębska-Ślizień A, Bryl E, Rachon D, Myśliwski A, Rutkowski B. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin decreases percentage of CD152(+) lymphocytes in primary glomerulonephritis haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(6):1070-80. **IF 2.84/ KBN: 11.0**
3. Trzonkowski P, Zaucha JM, Myśliwska J, Balon J, Szmit E, Hałaburda K, Bieniaszewska M, Mlotkowska M, Hellmann A, Myśliwski A. Differences in kinetics of donor lymphoid cells in response to G-CSF administration may affect the incidence and severity of acute GvHD in respective HLA-identical sibling recipients. *Med Oncol.* 2004;21(1):81-94. **IF 1.16 / KBN: 9.0**
4. Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Dobyszuk A, Myśliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol.* 2004;112(3):258-67. **IF 3.03/ KBN: 12.0**
5. Trzonkowski P, Dębska-Ślizień A, Szmit E, Myśliwska J, Szymańska K, Hak L, Myśliwski A, Rutkowski B. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin increases CD8+ T-cell apoptosis in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20(2):367-76. **IF 2.84/MNiI: 24.0**
6. Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Myśliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of CTL and NK cells in humans—impact of immunosenescence. *Clin Immunol.* 2006; 119 (3):307-316. **IF 3.03/ MNiI: 20.0**

Sumarycznie: **IF: 15.77/ KBN: 42.0/ MNiI: 44.0**

## BIBLIOGRAFIA

- Annacker O Burlen-Defranoux O, Pimenta-Araujo R, Cumano A, Bandeira A. (2000). "Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment." J Immunol. **164**: 3573-3580.
- Asseman C Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. (1999). "An essential role for IL10 in the function of regulatory cells that inhibit intestinal inflammation." J Exp Med. **190**: 995-1004.
- Azuma M Phillips J-H, Lanier L-L. (1993). "CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties." J Immunol. **150**: 1147-1159.
- Baecher-Allan C Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol. **167**(3): 1245-1253.
- Banz A Pontoux C, Papiernik M. (2002). "Modulation of FAS-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of CD4 regulatory T cells and effector T cells. ." J Immunol. **169**: 750-757.
- Battaglia M Gregori S, Bacchetta R, Roncarolo MG. (2006). "Tr1 cells: From discovery to their clinical application." Semin Immunol. **18**(2): 120-127.
- BD Bioscience (2005). "Newsletter - T regulatory cells." **Spring 2005**.
- Belkaid Y Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity." Nature **420**(6915): 502-507.
- Belkaid Y Rouse BT. (2005). "Natural regulatory T cells in infectious disease. ." Nat. Immunol. **6**: 353-360.
- Bennett CL Brunkow ME, Ramsdell F, O'Briant KC, Zhu Q, Fuleihan RL, Shigeoka AO, Ochs HD, Chance PF. (2001). "A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA leads to the IPEX syndrome." Immunogenetics. **53**: 435-439.
- Billingham RE Brent L, Medawar PB. (1953). "Activity acquired tolerance of foreign cells." Nature **172**: 603-606.
- Bluestone JA (2005). "regulatory t-cell therapy: is it ready for the clinic?" Nat Rev Immunol. **5**: 343-349.
- Boden E Tang Q, Bour-Jordan H, Bluestone JA. (2003). "The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." Novartis Found Symp. **252**: 55-63.
- Boucher N Dufeu-Duchesne T, Vicaut E, Farge D, Effros RB, Schachter F. (1998). "CD28 expression in T cell aging and human longevity. ." Exp Gerontology **33**: 267-282.

Bryl E Mysliwska J, Debska-Slizien A, Trzonkowski P, Rachon D, Bullo B, Zdrojewski Z, Mysliwski A, Rutkowski B. (1999). "Recombinant human erythropoietin stimulates production of interleukin 2 by whole blood cell cultures of hemodialysis patients." Artif Organs. **23**(9): 809-816

Chang CC Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suci-Foca N. (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." Nat Immunol. **3**(3): 237-243.

Chattopadhyay S Mehrotra S, Chhabra A. (2006). "Effect of CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) T regulatory cells on the generation of cytolytic T cell response to a self but human tumor-associated epitope in vitro." J Immunol. **176**(2): 984-990.

Cohen JL Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. (2002). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft versus host disease. ." J Exp Med. **196**: 401-406.

Colovai AI Liu Z, Ciubotariu R, Lederman S, Cortesini R, Suci-Foca N. (2000). "Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells." Transplantation. **69**(7): 1304-1310.

Effros RB (2000). "Costimulatory mechanisms in the elderly. ." Vaccine. **18**: 1661-1665.

Effros RB Boucher N, Porter V, Zhu X, Spaulding C, Walford RL, Kronenberg M, Cohen D, Schachter F. (1994). "Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence." Exp Gerontol. **29**(6): 601-609.

Eylar EH Lefranc CE, Yamamura Y, Baez I, Colon-Martinez SL, Rodriguez N, Breithaupt TB. (2001). "HIV infection and aging: enhanced Interferon- and Tumor Necrosis Factor-alpha production by the CD8+ CD28- T subset." BMC Immunol **2**: 10.

Firan M Dhillon S, Estess P, Siegelman MH. (2006). "Suppressor activity and potency among regulatory T cells is discriminated by functionally active CD44." Blood. **107**(2): 619-627.

Fontenot JD Rudensky AY. (2005). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3." Nature Immunology **6**(331 - 337).

Franceschi C Valensin S, Fagnoni F, Barbi C, Bonafe M. (1999). "Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load." Exp Gerontol. **34**: 911-921.

Fujimoto S Greene M, Sehon AH. (1975). "Immunosuppressor T cells in tumour bearing host." Immunol. Commun. **4**: 201 -217.

Gavin M Rudensky A. (2003). "Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells." Curr Opin Immunol. **15**(6): 690-696.

Gershon RK Kondo K. (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance:the role of thymic lymphocytes." Immunology **18**: 723 -737.

Gershon RK Kondo K. (1971). "Infectious immunological tolerance." Immunology **21**: 903 - 914.

Ghiringhelli F Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L. (2005). "CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner." J Exp Med. **202**(8): 1075-1085.

Godfrey WR (2004). "In vitro-expanded human CD4 + CD25 + Tregulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures." Blood **104**: 453-461.

Gorochov G Debre P, Leblond V, Sadat-Sowti B, Sigaux F, Autran B. (1994). "Oligoclonal expansion of CD8+CD57+ T cells with restricted T-cell receptor beta chain variability after bone marrow transplantation. ." Blood **83**: 587-595.

Grohmann U Puccetti P. (2003). "CTLA-4, T helper lymphocytes and dendritic cells: an internal perspective of T-cell homeostasis." Trends Mol Med. **9**(4): 133-135.

Grubeck-Loebenstein B . (1997). "Changes in the aging immune system." Biologicals **25**: 205-208.

Hoffmann P Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. (2004). "Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)/CD25high regulatory T cells." Blood. **104**: 895-903.

Hoffmann P Ermann J, Edinger CG, Fathman CG, Strober S. (2002). "Donor-type CD4+CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute GvHD." J Exp Med. **196**: 401-406.

Huang X Zhu J, Yang Y. (2005). "Protection against autoimmunity in nonlymphopenic hosts by CD4+ CD25+ regulatory T cells is antigen-specific and requires IL-10 and TGF-beta." J Immunol. **175**(7): 4283-4291.

Iellem A Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells. ." J Exp Med. **194**: 847-853.

Iezzi G Karjalainen K, Lanzavecchia A. (1998). "The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cell." Immunity **8**: 89-95.

Itoh M Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi F. (1999). "Thymus and autoimmunity: production of CD4+CD25+ naturally anergic and suppressive T cells as as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance." J Immunol. **162**(9): 5317-5326.

Ji HB Liao G, Faubion WA, Abadia-Molina AC, Cozzo C, Laroux FS, Caton A, Terhorst C. (2004). "The natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. ." J Immunol. **172**: 5823-5827.

Jiang S Tugulea S, Pennesi G, Liu Z, Mulder A, Lederman S, Harris P, Cortesini R, Suci-Foca N. (1998). "Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. ." Hum Immunol. **59**(11): 690-699.

Karim M Feng G, Wood KJ, Bushell AR. (2005). "CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation." Blood **105**(12): 4871-4877

Karim M Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ. (2004). "Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process." J Immunol. **172**: 923-928.

Karlsson MR Rugtveit J, Brandtzaeg P. (2004). "Allergen-responsive CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Children who Have Outgrown Cow's Milk Allergy." J Exp Med. **199**: 1679-1688.

Kim-Schulze S Seki T, Vlad G, Scotto L, Fan J, Colombo PC, Liu J, Cortesini R, Suci-Foca N. (2006). "Regulation of ILT3 gene expression by processing of precursor transcripts in human endothelial cells." Am J Transplant. **6**(1): 76-82.

Kitani A Chua K, Nakamura K, Strober W. (2000). "Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells." J Immunol. **165**: 691-702.

Koenen HJ Fasse E, Joosten I. (2005). "CD27/CFSE-based ex vivo selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory T cells." J Immunol. **174**(12): 7573-7583.

Kohm AP Miller SD. (2003). "Role of ICAM-1 and P-selectin expression in the development and effector function of CD4+CD25+regulatory T cells." J Autoimmun. **21**(3): 261-271

Ku CC Kappler J, Marrack P. (2001). " The growth of the very large CD8+ T cell clones in older mice is controlled by cytokines." J Immunol. **166**(4): 2186-2193.

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. (2002). "Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. ." J Clin Invest. **109**(1): 131-140.

Li J Liu Z, Jiang S, Cortesini R, Lederman S, Suci-Foca N. (1999). "T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC." J Immunol. **163**(12): 6386-6392.

Linsley PS Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. (1992). "Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. ." J Exp Med. **176**: 1595-1599.

Maloy KJ Powrie F. (2005). "Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit" Nat Immunol. **6**: 1071-1072.

- Masteller EL Tang Q, Bluestone JA. (2006). "Antigen-specific regulatory T cells -- ex vivo expansion and therapeutic potential." Semin Immunol. **18**(2): 103-110.
- Mazariegos GV Zahorchak AF, Reyes J, Ostrowski L, Flynn B, Zeevi A, Thomson AW. (2003). "Dendritic cell subset ratio in peripheral blood correlates with successful withdrawal of immunosuppression in liver transplant patients." Am J Transplant. **3**(6): 689-696.
- Mellor AL Munn DH. (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol. **4**(10): 762-774.
- Miller SD Vanderlugt CL, Lenschow DJ, Pope JG, Karandikar NJ, Dal Canto MC, Bluestone JA. (1995). "Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE." Immunity **3**(6): 739-745.
- Miyara M Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Kambouchner M, Valeyre D, Chapelon-Abric C, Debre P, Piette JC, Gorochoff G. (2006). "The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells." J Exp Med. **203**(2): 359-370.
- Munn DH Sharma MD, Mellor AL. (2004). "Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells." J Immunol. **172**(7): 4100-4110.
- Myśliwska J (1999). "Zmiany ekspresji receptorów powierzchniowych limfocytów T w trakcie starzenia." Post Biol Kom **26**: 29-48.
- North RJ Bursucker I. (1984). "Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1 + 2 – suppressor T cells downregulate the generation of Ly-1 – 2 + effector T cells." J Exp Med. **159**: 1295 -1311.
- Owen RD (1945). "Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins." Science **102**: 400-401.
- Papiernik M do Carmo Leite-de-Moraes, Pontoux C, Joret AM, Rocha B, Penit C, Dy M. ; : (1997). "T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL10-producing T cell population with infectious capacity." J Immunol. **158**: 4642-4653.
- Patel M Xu D, Kewin P, Choo-Kang B, McSharry C, Thomson NC, Liew FY. (2005). "Glucocorticoid-induced TNFR family-related protein (GITR) activation exacerbates murine asthma and collagen-induced arthritis." Eur J Immunol. **35**(12): 3581-3590.
- Perillo NL Naeim F, Walford RL, Effros RB. (1993). "The in vitro senescence of human T lymphocytes: failure to divide is not associated with a loss of cytolytic activity or memory T cell phenotype." Mech Ageing Dev. **67**(1-2): 173-185.
- Piccirillo CA Shevach EM. (2001). "Control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells." J Immunol. **167**: 1137-1140.

Sakaguchi S (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." Cell **101**: 455-458.

Sakaguchi S Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995). "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**(3): 1151-1164.

Salomon B Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. (2000). "B7/Cd28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." Immunity **12**: 431-440.

Saurwein-Teissl M Lung TL, Marx F, Gschosser C, Asch E, Blasko I, Parson W, Bock G, Schonitzer D, Trannoy E, Grubeck-Loebenstein B. (2002). "Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)/CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines." J Immunol. **168**(11): 5893-5899.

Schwartz RH (2005). "Natural regulatory T cells and self-tolerance " Nat Immunol. **6**: 327 - 330.

Scotto L Naiyer AJ, Galluzzo S, Rossi P, Manavalan JS, Kim-Schulze S, Fang J, Favera RD, Cortesini R, Suci-Foca N. (2004 ). "Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells." Hum Immunol. **65**(11): 1297-1306.

Sindhi R Manavalan JS, Magill A, Suci-Foca N, Zeevi A. (2005). "Reduced immunosuppression in pediatric liver-intestine transplant recipients with CD8+CD28- T-suppressor cells." Hum Immunol. **66**(3): 252-257.

Smyth MJ Teng MW, Swann J, Kyriakopoulos K, Godfrey DI, Hayakawa Y. (2006). "CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer." J Immunol. **176**(3): 1582-1587.

Spaulding C Guo W, Effros RB. (1999). "Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. ." Exp Gerontol. **34**(633-44).

Suci-Foca N Manavalan JS, Cortesini R. (2003). "Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells." Transpl Immunol. **11**(3-4): 235-244.

Suffia I Reckling SK, Salay G, Belkaid Y. (2005 ). "A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of Leishmania major infection." J Immunol. **174**(9): 5444-5455.

Suffia IJ Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. (2006). "Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens." J Exp Med. **203**(3): 777-788



Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. (2001). "Human anergic/suppressive CD4+CD25+ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population." Eur J Immunol **31**: 1122-1131

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Sakaguchi S. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med. **192**: 303-310.

Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. (2004). "CD25 + CD4 + T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." J Exp Med. **199**: 1467-1477.

Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4 CD25 immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." Blood. **99**: 3493-3499.

Trenado A, Sudres M, Tang Q, Maury S, Charlotte F, Gregoire S, Bonyhadi M, Klatzmann D, Salomon BL, Cohen JL. (2006). "Ex vivo-expanded CD4+CD25+ immunoregulatory T cells prevent graft-versus-host-disease by inhibiting activation/differentiation of pathogenic T cells." J Immunol. **176**(2): 1266-1273.

Trzonkowski P (2003). "Zjawiska immunologiczne towarzyszące szczepieniom przeciw grypie u ludzi w wieku starszym - rozprawa na stopień doktora nauk medycznych." AMG.

Trzonkowski P (2006). "Opracowanie techniki ekspansji ludzkich komórek regulatorowych Treg CD4+CD25+ in vitro w aspekcie możliwości ich zastosowania w immunoterapii adoptywnej." Ministerstwo Nauki i Informatyzacji Projekt własny: Nr projektu 2 P05A 100 130

Trzonkowski P (b) Mysliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB, Machala M, Mysliwski A. (2003). "Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. ." Vaccine. **21**(25-26): 3826-3836.

Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszuk A, Mysliwski A. (2004). "CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. ." Clin Immunol. **112**(3): 258-267.

Trzonkowski P, Z. M., Friend P, Wood KJ. (2005). "Alemtuzumab therapy impacts leukocyte phenotype and function." Transpl Immunol. **18**(s1): 46.

Waldmann H, Cobbold S. (1998). "How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance?" Annu Rev Immunol. **16**: 619-644.

Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJ, Carmichael AJ. (2002). "Identification of naive or antigen-experienced human CD8(+) T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8(+) T cell response.

. " J Immunol. **168**(11): 5455-5464.

Wood KJ Sakaguchi S. (2003). "Regulatory T cells in transplantation tolerance." Nat Rev Immunol. **3**(3): 199-210.

Wu Z Bensinger SJ, Zhang J, Chen C, Yuan X, Huang X, Markmann JF, Kassaei A, Rosengard BR, Hancock WW, Sayegh MH, Turka LA. (2004). "Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance." Nat Med. **10**(1): 87-92.

Yamaguchi S Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. (2001). "A role for TGF-beta generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. ." J Immunol. **166**: 7282-7289.

Zhang H Meadows GG. (2005). "Chronic alcohol consumption in mice increases the proportion of peripheral memory T cells by homeostatic proliferation." J Leukoc Biol. **78**(5): 1070-1080.

Zheng SG Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA. (2006). "TGF-beta Requires CTLA-4 Early after T Cell Activation to Induce FoxP3 and Generate Adaptive CD4+CD25+ Regulatory Cells." J Immunol. **176**(6): 3321-3329.