

# Imunska toleranca

## Immune tolerance

Matjaž Jeras,<sup>1,2,3</sup> Urban Švajger<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Celica, Biomedicinski center d.o.o., Tehnološki park 24, 1000 Ljubljana

### Korespondenca/ Correspondence:

dr. Urban Švajger, mag. farm., Zavod RS za Transfuzijsko Medicino, Štajmerjeva 6, SI-1000 Ljubljana, Slovenija  
Email: svajgerurban@yahoo.com  
doc. dr. Matjaž Jeras, mag. farm., UL- Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, SI-1000 Ljubljana, Slovenija  
Email: matjaz.jeras@ffa.uni-lj.si

### Ključne besede:

osrednja toleranca, periferna toleranca, dendritične celice, regulatorni limfociti T, tolerogenost

### Key words:

central tolerance, peripheral tolerance, dendritic cells, regulatory T cells, tolerogenicity

### Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2011; 80: 944–56

### Izvleček

**Izhodišča:** Mehanizmi imunske tolerance so pomemben del homeostaze imunskega sistema, ki zagotavlja celovitost našega organizma. Ko govorimo o imunskem odzivu, največkrat pomislimo na učinkovito aktiviranje številnih dejavnikov, ki omogočajo, da se s pomočjo celične in protitelesne oziroma humoralne imunosti uspešno obranimo pred škodljivim delovanjem najrazličnejših telesu tujih snovi in dejavnikov. Pri tem pa večinoma ne razmišljamo o tem, da mora biti vsak aktivacijski obrambni mehanizem uravnan z nasprotno delujočim, zaviralnim procesom. S tem je namreč zagotovljen ustrezen obseg imunske reaktivnosti brez nepotrebnega in škodljivega izčrpanja organizma ter razmeroma hitro vračanje na raven normalnega, uravnoveženega fiziološkega stanja, kar je osnovni cilj delovanja homeostaznih mehanizmov. Tako naravno, dinamično ravnovesje »jin/jang«, ki je ključno za zdravje vsakega posameznika, lahko zagotavlja le dobro nadzorovano in uravnoveženo delovanje efektorskih imunskih celic, in sicer tako aktiviranih limfocitov CD4<sup>+</sup>, vrste Th1, Th2 in Th17, citotoksičnih limfocitov CD8+, naravnih celic ubijalk (NK), limfocitov B in ostalih aktivacijskih dejavnikov na eni strani ter nasprotno delujočih imunosupresivnih celic, med katere uvrščamo različne vrste regulatornih CD4+ in CD8+ limfocitov T in tolerogenih antigene-predstavljajočih celic (APC) ter ostale zaviralne dejavnike, na drugi strani. V kolikor se to ravnovesje poruši in nagne na eno ali drugo stran, se lahko pojavijo bodisi avtoimunske bolezni, ki so posledica nepreprečene reaktivnosti zoper lastne antigene, ali pa nebrzdan razrast rakavih celic zaradi prekomernega negativnega imunskega uravnavanja, ki lahko popolnoma izniči protitumorske efektorske mehanizme imunskega sistema.

**Zaključki:** V našem prispevku predstavljamo najnovejša dognanja na področju preučevanja

in razumevanja mehanizmov imunske tolerance, ki je pomembni del homeostaze pri človeku, ter potencialne možnosti za njihovo terapevtsko uporabo v obliki naprednega celičnega zdravljenja predvsem avtoimunskih bolezni ter pri preprečevanju zavrnitvenih odzivov po alogenskih presaditvah tkiv in organov.

### Abstract

**Background:** Regulation of human immune system through mechanisms of immune tolerance is an exceptionally important part of the homeostasis that protects the integrity of our organism. Whenever we talk about immune responses, we primarily consider them as an efficient activation of numerous factors enabling our cellular and humoral immunity to protect us against noxious effects of various forms of pathogens. However, each of these activation processes must be adequately regulated by appropriate immunosuppressive mechanisms, thereby providing a rational extent of immune reactivity without exhausting the organism and at the same time assuring a rather quick reestablishment of normal physiological conditions, which is a basic task of immune homeostasis. Such natural and dynamic »yin/yang« balance, being crucial for the well-being of each individual, can only be provided by well orchestrated specific interactions between activated effector immune cells, such as Th1, Th2 and Th17 CD4+ lymphocytes, CD8+ cytotoxic T lymphocytes, natural killer cells (NK) and other activating factors on one side, and the oppositely functioning immunoregulatory effectors, such as regulatory CD4+ and CD8+ T lymphocytes, tolerogenic antigen-presenting cells (APC) and other immunosuppressive factors, on the other. In the case of a collapse or an imbalance of this system, there are serious consequences that are reflected in the occurrence of autoimmune diseases, in which case the immune system is unsuccessfully suppressing the reactivity against

Prispelo: 31. maj 2011,  
Sprejeto: 29. sept. 2011

self-antigens or the outburst of cancer cells, due to the excessive negative regulatory immune mechanisms that are actively protecting tumors.

**Conclusions:** In this review we are presenting novel findings regarding the mechanisms of tolerance as an important part of immune homeo-

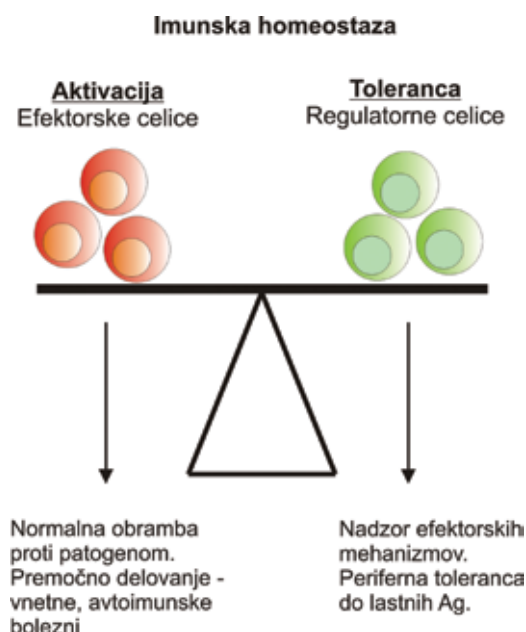
stasis and discussing the potential of translating this knowledge into clinical setting by developing advanced cell therapies, mostly for treating autoimmune diseases and preventing graft rejection following allogeneic tissue and organ transplantation.

## Uvod

Osnovni nalogi imunske tolerance sta prav gotovo zagotavljanje in vzdrževanje ne-reaktivnosti na telesu lastne antigene (Ag). Ob tem pa nas mora imunski sistem varovati tudi pred celo vrsto različnih, telesu tujih patogenih dejavnikov, zlasti mikroorganizmov, in se pri tem izogniti napačno usmerjeni ali prekomerni reaktivnosti, ki bi lahko resno ogrozila normalno delovanje organizma. Vprašanje, ki si ga v današnjem času pogosto zastavljamo in nanj iščemo ustrezne odgovore, je, kako lahko naš imunski sistem ohranja sila občutljivo ravnotežje med potentnimi efektorskimi in tem ustrezno prilagojenimi nasprotno delujočimi regulatornimi mehanizmi (Slika 1). V normalnih razmerah antigensko-specifično aktivirani limfociti v okviru pridobljene imunosti poskrbijo za popolno odstranitev patogenih mikroorganizmov. Vendar pa pri tem vedno obstaja tudi določena, čeprav majhna verjetnost, da bi se lahko posamezni kloni efektorskih imunskih celic hkrati premočno odzvali na prepoznavo telesu lastnih antigenov

in s tem povzročili kronično vnetno odzivanje ter neželene poškodbe tkiv ali celo izzvali kakšno od avtoimunskih bolezni. V perifernem krvnem obtoku so dejansko lahko prisotni posamezni limfociti T in B, ki se v vnetnem mikrookolju pretirano močno odzovejo na prepoznavo posameznega lastnega antigena, ali pa takšni, ki zaradi prevelike podobnosti oziroma molekulske mimikrije med strukturama antigena, ki je del patogenega mikroorganizma in določene telesu lastne molekule, s svojimi antigenskimi receptorji v določenem trenutku niso več sposobni razlikovati med njima.<sup>1</sup> Obstoj prvih je posledica neustrezne selekcije klonskega repertoarja antigenskih receptorjev, izraženih na površini dozorevajočih limfocitov, ki poteka v okviru procesa vzpostavljanja osrednje imunske tolerance v timusu in kostnem mozgu.<sup>2</sup> Vse takšne prekomerne oziroma neželene avtoagresivne imunske odzive, do katerih lahko pride med aktiviranjem efektorskih imunskih celic na periferiji, morajo nadzorovati in obvladovati raznovrstni mehanizmi uravnavanja, ki jih označujemo s skupnim imenom periferna imunska toleranca.<sup>3</sup>

V kolikor omenjeni nadzorni mehanizmi ne delujejo pravilno, lahko pride do prevlade bodisi efektorskih ali regulatornih oblik imunskega odziva in s tem povezanega nastanka različnih imunsko pogojenih bolezni. Zato je izjemno pomembno dobro poznavanje tako molekularnih mehanizmov, ki so odgovorni za tovrstno patologijo, kakor tudi aktivnih vlog posameznih elementov oziroma dejavnikov imunskega sistema, ki so pri tem udeleženi. Šele opremljeni s takšnim znanjem lahko ustrezno načrtujemo nove terapevtske pristope, ki bi nam omogočili učinkovito preprečevanje vzrokov in ne le blaženje posledic omenjenih patoloških stanj.



**Slika 1:** Shematski prikaz ravnovesja, ki ga vzdržujejo kompleksni mehanizmi imunske homeostaze.

## Mehanizmi osrednje (centralne) imunske tolerance

Limfociti T in B nastajajo iz krvotvornih matičnih celic v kostnem mozgu. Nadaljnje dozorevanje celic T v funkcionalne limfocite  $CD4^+$  in  $CD8^+$  poteka v timusu, medtem ko so celice B temu procesu podvržene v kostnem mozgu.<sup>4-6,7</sup> Tako kostni mozeg kot timus sodita med osrednje oziroma centralne limfatične organe. Osrednja imunska toleranca predstavlja osnovni selekcijski proces, med katerim velika večina novo nastalih predhodnikov limfocitov T in B zaradi neizpolnjevanja strogih meril funkcionalnega preverjanja avtoreaktivnosti njihovih antigenjskih receptorjev podleže programirani celični smrti ali apoptozi. Razvoj obeh osnovnih vrst celic pridobljene imunosti poteka preko številnih vmesnih fenotipov njihovih dozorevajočih predhodnikov vse do oblikovanja dokončnega, zrelega in klonsko porazdeljenega repertoarja T-celičnih (TCR) in B-celičnih antigenjskih receptorjev (BCR) vsakega posameznika. Izjemna raznolikost TCR ( $\sim 10^{18}$  možnih različic), ki so v več kot 95 % zgrajeni iz transmembranskih verig  $\alpha$  in  $\beta$ , in BCR ( $\sim 5 \times 10^{13}$  možnih različic), površinsko izraženih imunoglobulinskih molekul, nastane zaradi popolnoma naključnega somatskega preurejanja variabilnih (V), diverzifikacijskih (D) in povezovalnih (J) genskih segmentov, ki kodirajo najpolimorfnejše, antigene prepoznavajoče dele obeh vrst receptorskih molekul.<sup>8,9</sup>

### Pozitivna in negativna selekcija limfocitov T v timusu

Klonska izbira nezrelih limfocitov T (timocitov) poteka v timusu, in sicer na osnovi dveh nasprotujočih si mehanizmov: pozitivne in negativne selekcije. Dvojno pozitivni (DP) timociti  $CD4^+CD8^+$ , predhodniki zrelih limfocitov T, v skorji timusa s svojimi dozorevajočimi TCR prepoznavajo komplekse med najpogostejšimi telesu lastnimi antigenjskimi peptidi in molekulami poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti razredov I in II, ki jih pri človeku označujemo s kratico HLA (*angl.* Human Leukocyte Antigens). Omenjene komplekse na svojih površinah

izražajo timusne kortikalne epitelne in dendritične celice (DC), ki v skladu s preverjeno funkcionalnostjo posameznih klonov dvojno pozitivnih timocitov oziroma njihovih TCR zagotovijo signale za njihovo pozitivno selekcijo oziroma preživetje.<sup>2</sup> Prežive le tisti celični kloni, katerih TCR so se sposobni specifično vezati na komplekse HLA/lastni peptid, in to z določeno, ne prešibko in ne premočno afiniteto.

Positivno izbrani dvojno pozitivni timociti  $CD4^+CD8^+$  začnejo izražati kemokinski receptor CCR7, v njih pa se sproži tudi program za diferenciacijo v enojno pozitivne  $CD4^+$  ali  $CD8^+$  celice T. Zaradi izražanja CCR7 se enojno pozitivni timociti pomaknejo v timusno sredico, kamor jih pritegne ta topna kemokinska dejavnika CCL19 in CCL21, ki ju proizvajajo tamkajšnje epitelne celice.<sup>10</sup> V timusni sredici se nadaljuje selekcija enojno pozitivnih timocitov s pomočjo stromalnih celic, med katere poleg DC uvrščamo tudi specializirane epitelne celice. Slednje izražajo gen *AIRE* (*angl.* Autoimmune Regulator), ki jim omogoča, da kot antigene predstavljajoče celice (APC) ponujajo v prepoznavo timocitom  $CD4^+$  in  $CD8^+$  tudi redko dostopne, telesu lastne antigene, ki so sicer značilni le za določena tkiva. Ugotovili so namreč, da je gen *AIRE* odgovoren za nastajanje cele vrste antigenov, ki so izraženi npr. le na jetrnih celicah ali celicah  $\beta$  trebušne slinavke, s čimer zagotavlja veliko širšo antigeno predstavitevno paleto, kot bi jo lahko pričakovali v samem timusu.<sup>11,12</sup> Vsi tisti kloni enojno pozitivnih timocitov, katerih TCR s preveliko afiniteto specifično reagirajo s kompleksi molekul HLA in nanje vezanih telesu lastnih peptidnih antigenov, prejmejo od APC, torej od DC in epitelnih celic timusne sredice, s katerimi so v tesni interakciji, negativne signale in propadejo z apoptozo. Govorimo o procesu negativne selekcije ali klonske delecije, s katerim se iz imunskega repertoarja odstranijo avtoreaktivni limfociti T. Dozorevanje enojno pozitivnih timocitov v timusni sredici pa obsega tudi nastanek in izbiro razmeroma majnih količin antigeno-specifičnih naravnih regulatornih  $CD4^+$  limfocitov Treg ( $\sim 10\%$  vseh celic T) in supresorskih  $CD8^+$  celic Ts.<sup>18</sup> Dokončno preverjeni in izbrani zreli limfo-

citi T nato izrazijo receptorje za sfingozin-1-fosfat (SiP), kar jim omogoča, da lahko iz timusa neovirano preidejo v krvni obtok.<sup>13</sup>

Ker pa tako pozitivna kot negativna izbira timocitov temeljita na isti osnovi, to je na zaznavi celične reaktivnosti po prepoznavi lastnih antigenov v kontekstu molekul poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti, je več kot očitno, da se morata specifičnost in jakost signalov ki lahko povzročijo bodisi izbiro ali propad preizkušanih celic, med seboj razlikovati.

### Pozitivna in negativna selekcija limfocitov B v kostnem mozgu

V kostnem mozgu dozorevajoči predhodniki limfocitov B so preko interakcije s stromalnimi celicami podvrženi preizkusu specifične reaktivnosti njihovih površinsko izraženih antigenskih BCR vrste IgM. Pri tem prepoznavajo telesu lastne antigene, in sicer tako v obliki pogostih, splošno prisotnih večvalentnih površinskih kot tudi nizko valentnih topnih antigenov. Pretirana avtoreaktivnost posameznih, klonsko porazdeljenih BCR na prve, med katere sodijo npr. lastne molekule HLA, sproži klonsko delecijo z apoptozo tistih predhodnikov limfocitov B, ki takšne receptorje izražajo. Pri tem pa je čas do nastopa apoptoze nekoliko zamaknjen, tako da lahko v vmesnem intervalu taki avtoreaktivni kloni izvedejo dodatno preureditev genskih segmentov in s tem morda uspejo spremeniti svoje antigenske BCR tako, da ti niso več avtoreaktivni.<sup>14</sup> Tako npr. izmed približno  $2 \times 10^7$  limfocitov B, ki nastanejo v kostnem mozgu miši, le 1–3 % vseh uspešno zaključijo dozorevanje in preide v periferni krvni obtok.<sup>16,17</sup> Tisti kloni celic B, ki specifično prepoznavajo in vežejo lastne topne nizko valentne antigene pa ne propadejo, ampak le izgubijo sposobnost izražanja antigenskih BCR IgM na svojih površinah. Potem ko migrirajo v periferni krvni obtok namreč izražajo le BCR vrste IgD in zato brez ustrezne pomoči avtoantigeno specifičnih  $CD4^+$  limfocitov T ne morejo reagirati z antigeni, kar pomeni, da so anergični. Le tisti kloni limfocitov B, ki med dozorevanjem v kostnem mozgu s svojimi BCR IgM ne reagirajo z nobenim

lastnim antigenom, lahko neovirano preidejo na periferijo, kjer se nato lahko aktivirajo z različnimi, telesu tujimi antigeni. Takšne pozitivno izbrane zrele celice B hkrati izražajo transmembranske antigenske BCR vrste IgM in IgD.<sup>15</sup> Njihovo preživetje in obstoj v krvnem obtoku pa sta v celoti odvisna od signalov, ki jih morajo občasno prejeti v B-celičnih foliklih perifernih oziroma sekundarnih limfnih tkiv.

Limfociti B so lahko poleg klonske delecije, zaradi premočnega prepoznavanja lastnih antigenov, podvrženi tudi klonskemu utišanju oziroma klonski anergiji, poleg tega pa tudi klonski ignoranci. V slednjem primeru takšne celice v normalnih okoliščinah antigena ne zaznajo, lahko pa se z njim aktivirajo v vnetnem mikrookolju. V kolikor se zgodi, da posamezni zreli avtoreaktivni kloni limfocitov B kljub dosledni osrednji selekciji uspejo priti v krvni obtok, za svoje aktiviranje nujno potrebujejo prisotnost ustrezne količine specifičnega avtoantigena, poleg tega pa v večini primerov tudi pomoč avtoreaktivnih  $CD4^+$  limfocitov T, kar pa je k sreči le malo verjetno.

### Mehanizmi periferne imunske tolerance

Avtoreaktivni limfociti, ki jim uspe zaobiti nadzor mehanizmov vzpostavljanja osrednje tolerance, ter tisti, ki postanejo avtoreaktivni na periferiji, lahko v kasnejših življenjskih obdobjih resno ogrozijo naše zdravje, saj so potencialni povzročitelji nastanka in razvoja avtoimunskih bolezni. Za to, da je takšnih neželenih dogodkov razmeroma malo, pa skrbijo raznovrstni mehanizmi druge varovalne ravni v imunskem sistemu, ki ga imenujemo periferna tolerance. Njeni osnovni nalogi sta nadzor nad potekom in uravnavanje obsega imunskih reakcij, ki nenehno potekajo v perifernih tkivih in sekundarnih limfnih organih. Med kompleksne mehanizme periferne tolerance sodijo:

- sekvestracija telesu lastnih antigenov: v fizioloških pogojih so ti bodisi fizično skriti ali pa nedostopni za prepoznavo z morebitnimi avtoreaktivnimi kloni limfocitov T, npr. zaradi odsotnosti ustre-



- znih APC v nekaterih tkivih, kar velja predvsem za centralni živčni system;<sup>19</sup>
- samo mikrookolje v imunsko privilegiranih tkivih in organih, ki aktivno preprečuje odzivanje avtoreaktivnih celic T na lastne antigene tako, da sproži njihovo apoptozo po vezavi molekul Fas (CD95), izraženih na infiltrirajočih limfocitih T na ligande FasL (CD95L), ki so prisotni na tkivnih epitelih celicah (npr. roženice) in/ali proizvajajo velike količine protivnetnih citokinov, predvsem transformirajočega rastnega dejavnika  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in interleukina 10 (IL-10);<sup>19,20</sup>
  - neposredno in posredno imunosupresivno delovanje nezrelih in tolerogenih DC;
  - aktivno efektorsko nadziranje in negativno uravnavanje celičnih odzivov na lastne antigene, ki ga izvajajo naravno prisotni antigensko specifični limfociti Treg in periferno inducirane regulatorne celice T (vrst Tr1, Th3 in FoxP3<sup>+</sup>).

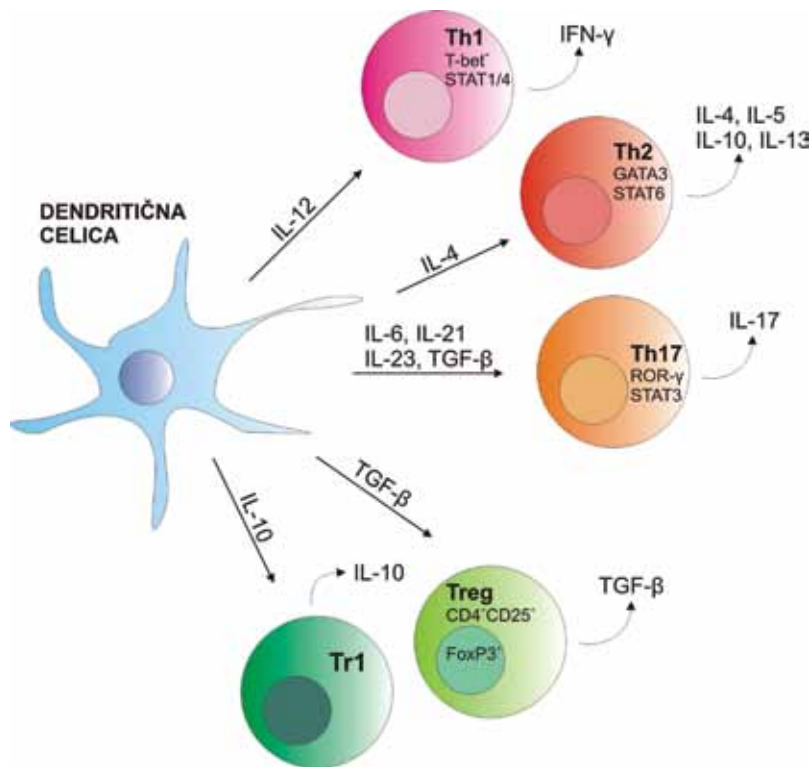
Mehanizmi periferne imunske tolerance torej preprečujejo aktiviranje avtoreaktivnih limfocitov v glavnem tako, da jih bodisi utišajo oziroma povzročijo njihovo neodzivnost (anergijo), ubijejo s sprožitvijo apoptoze ali pa njihov odziv zavrejo s proizvodnjem topnih imunosupresivnih dejavnikov. Pri tem igrajo osrednjo vlogo regulatorni limfociti T in regulatorne APC, med katerimi so nedvomno najučinkovitejše tolerogene DC.

Preden pridejo prvič v stik z ustreznimi antigeni so limfociti T na periferiji v t. i. navnem stanju. To pomeni, da se niso še nikoli aktivirali in zato ne izražajo za aktivacijo značilnih površinskih molekul oziroma ne proizvajajo vnetnih oziroma protivnetnih citokinov. Posamezni kloni limfocitov T lahko s pomočjo svojih edinstvenih TCR funkcionalno prepoznajo specifične antigene le v obliki peptidov, vezanih na ustrezne molekule pglavitnega kompleksa tkivne skladnosti, pri človeku HLA, izražene na površinah APC, torej DC, monocitov/makrofagov ali limfocitov B.<sup>21-25</sup> Antigenske peptide zunajceličnega izvora, ki se vežejo na molekule HLA razreda II (HLA-DR, -DQ ali -DP), lahko s svojimi TCR prepoznajo le CD4<sup>+</sup> limfociti T. Nasprotno pa lahko TCR, ki jih izražajo CD8<sup>+</sup> limfociti T, pre-

poznavajo izključno tiste antigenske peptide, praviloma znotrajceličnega izvora, ki so vezani na molekule HLA razreda I (HLA-A, -B ali -C). Prva interakcija aktivira različne vrste CD4<sup>+</sup> celic T pomagalk (Th), druga pa sproži nastanek efektorskih CD8<sup>+</sup> citotoksičnih limfocitov T (CTL). Vse antigene predstavljajoče celice aktivirajo limfocite T s podobnimi mehanizmi, vendar pa so pri tem DC najučinkovitejše in jih zato obravnavamo kot profesionalne APC. Dendritične celice odlikuje predvsem obilno površinsko izražanje bodisi kostimulatornih ali pa inhibitornih molekul, preko katerih, v kombinaciji z ustreznim proizvodnjem vnetnih ali protivnetnih citokinov, kar je odvisno od njihovega aktivacijskega stanja, lahko izzovejo nastanek aktivacijskih ali pa regulatornih celičnih imunskih odzivov<sup>26-28</sup> (Slika 2).

### Funkcije nezrelih in zrelih dendritičnih celic (DC)

Dendritičnih celic, za razliko od ostalih funkcionalnih APC, razen v izjemnih primerih, ne uvrščamo med efektorske celice imunskega sistema, temveč jih obravnavamo predvsem kot izjemno učinkovite posredovalke informacij o prisotnosti telesu lastnih in tujih antigenov.<sup>21,26</sup> V grobem lahko trdimo, da obstajajo v dveh aktivacijskih stanjih. Nezrele oziroma neaktivirane DC se nahajajo v mirujočem stanju tkivih tik pod telesnimi površinami, ki so v stiku z okoljem, torej v koži, pljučih in določenih področjih prebavil, kjer s procesi endocitoze in fagocitoze intenzivno vzorčijo svoje mikrookolje.<sup>29</sup> S tem privzemajo vse prisotne antigene, tako telesu lastne kot tudi tuje, jih predelajo v peptide in nato, vezane na molekule HLA, ponujajo v prepoznavo limfocitom T. Za nezrele DC je značilno šibko izražanje površinskih kostimulatornih molekul CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) in CD40 ter le skromna proizvodnja vnetnih citokinov.<sup>26</sup> Zaradi svoje umeščenosti so nezrele DC najpogosteje prve APC, ki pridejo v stik z različnimi patogeni. Njihovo prisotnost zaznajo s pomočjo nepolimorfni, skozi evolucijski razvoj ohranjenih receptorjev PRR (*angl.* Pattern Recognition Receptors), ki prepoznavajo značilne strukturne molekulske vzorce po-



**Slika 2:** Dendritične celice, ki se nahajajo v različnih aktivacijskih stanjih, lahko v odvisnosti od vrste proizvedenih citokinov izražanja kostimulativnih in inhibitornih molekul ter neposrednega mikrookolja izzevo nastanek različnih vrst funkcionalnih limfocitov T. Prikazani so tudi transkripcijski dejavniki in citokinski profili, značilni za posamezne vrste limfocitov T.

sameznih vrst mikroorganizmov.<sup>30</sup> Mednje uvrščamo na primer številne različne receptorje TLR (*angl.* Toll-Like Receptors), ki omogočajo, da se nezrele DC po srečanju z bakterijami in virusi zelo hitro aktivirajo, mobilizirajo in dozori, pri čemer se fenotipsko in funkcijsko izrazito spremenijo.<sup>26,31</sup> Aktivirane DC namreč izražajo obilico kostimulacijskih molekul in proizvajajo velike količine provnetnih citokinov, med katerimi sta najpomembnejša interleukin 12 (IL-12) ter tumorje nekrotizirajoči dejavnik  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Zaradi teh lastnosti so sposobne zelo učinkovito aktivirati naivne, antigensko specifične klone limfocitov T v področnih bezgavkah, kamor se premaknejo kmalu po aktiviranju v tkivih. To mobilnost pa jim omogoča izražanje kemokinskega receptorja CCR7.<sup>26</sup> Limfociti T CD4<sup>+</sup>, ki jih aktivirajo zrele DC v bezgavkah, so lahko vrste Th1, ki pomagajo pri aktiviranju makrofagov in dozorevanju CD8<sup>+</sup> citotoksičnih limfocitov T, ali pa vrste Th2, ki so nujni za nastanek humoralne imunosti oziroma tvorbe antigensko specifičnih protiteles.<sup>32,33</sup>

## Dendritične celice in vzpostavljanje periferne tolerance

Nezadostni kostimulacijski signali in večkratno zaporedno stimuliranje limfocitov T z nezrelimi DC *in vitro* lahko povzročijo T-celično neodzivnost in nastanek regulatornih limfocitov Tr1. Potem ko se celice Tr1 aktivirajo, proizvajajo večje količine imunosupresivnega citokina IL-10.<sup>34</sup> Nezrele DC so pomembne posredovalke periferne imunske tolerance *in vivo*. Ugotovili so namreč, da lahko tudi v stanju mirovanja v skromnem obsegu potujejo iz tkiv po aferentnih limfnih poteh v lokalne bezgavke, kjer na svojih površinah limfocitom T predstavljajo lastne antigene, potem, ko jih privzamejo s fagocitozo apoptotičnih tkivnih celic, ki jih predelajo v ustrezne peptide.<sup>35</sup> Ker takšna predstavitev avtoantigenov poteka ob šibki oziroma nezadostni kostimulaciji, to povzroči tolerogeni T-celični odziv.<sup>36</sup> Takšne interakcije so zelo pomembne zato, ker morajo za svoj obstanek v organizmu limfociti T preko svojih antigensko specifičnih TCR občasno prejeti preživetvene signale iz svojega mikrookolja. Hkrati s tem procesom pa poteka tudi preverjanje njihove avtoaktivnosti, pri čemer vsi tisti limfocitni kloni, ki pretirano reagirajo na lastno preventivno propadejo z apoptozo.

Kar nekaj časa je prevladovalo prepričanje, da lahko DC obstajajo izključno v nezrelem in zrelem stanju. S poglobljenimi raziskavami pa so dokazali, da imajo DC izjemno fenotipsko in s tem tudi funkcijsko plastičnost, ki je posledica njihovih številnih raznolikih oziroma alternativnih aktivacijskih stanj. Pomembno je bilo predvsem spoznanje, da lahko DC poleg kostimulacijskih molekul in vnetnih citokinov izražajo tudi površinske inhibitorne molekule in proizvajajo topne imunosupresivne dejavnike, in sicer: imunoglobulinu-podobne prepise (*angl.* Immunoglobulin-Like Transcripts) ILT2, ILT3 in ILT4; molekule HLA-G, ki sodijo v pglavitni kompleks tkivne skladnosti razreda I; ligande receptorja programirane celične smrti 1, PDL-1; ligande molekule Fas, FasL ter imunosupresivne citokine, zlasti IL-10 in TGF- $\beta$ .<sup>37-43,44,45</sup> Takšne alternativno aktivirane DC imenujemo tolerogene DC.

Kot smo že omenili, lahko nezrele DC povzročijo T-celično anergijo ali izzovejo nastanek perifernih regulatornih limfocitov T zaradi nesposobnosti zagotovitve zadostnega obsega kostimulacijskih signalov. V tem primeru govorimo o mehanizmi pasivne tolerance. V primerjavi z nezrelimi pa lahko tolerogene DC inducirajo imunosupresivne celične odzive, vključno z nastankom perifernih regulatornih limfocitov T, v veliko večjem obsegu in v bistveno krajšem času. To dosežejo z mehanizmi aktivne tolerance, ki temeljijo na signalizaciji preko njihovih inhibitornih molekul in na proizvodnji velikih količin imunosupresivnih citokinov.

### Prisotnost tolerogenih dendritičnih celic *in vivo* ter načini njihove priprave *in vitro*

V človeškem telesu sta fenotip in funkcija DC močno povezana z anatomskim področjem in s specifičnim tkivnim mikrookoljem, v katerem se nahajajo. Pri tem se lahko v različnih predelih telesa njihova izpostavljenost antigenom precej razlikuje. Tako mora naprimer imunski sistem v črevesju tolerirati obstoj številnih komensalnih bakterij. Zato ne preseneča dejstvo, da tiste DC, ki so v tem delu organizma, po aktiviranju proizvajajo predvsem TGF- $\beta$ , po antigensko specifični interakciji z naivnimi CD4<sup>+</sup> limfociti T pa povzročijo njihovo pretvorbo v regulatorne imunosupresivne celice vrste Th3, ki prav tako izločajo večje količine TGF- $\beta$ .<sup>53,54</sup> Kakšne pa so lastnosti DC v pljučih? Iz pljučnega tkiva so osamili tiste DC, ki so bile predhodno v stiku z antigeni, ki so prišli v telo preko dihal in ugotovili, da po aktiviranju ne proizvajajo večjih količin vnetnih citokinov, temveč predvsem IL-10.<sup>55</sup> Poleg tega pa so bile takšne tkivno specifične tolerogene DC sposobne inducirati tudi nastanek perifernih regulatornih limfocitov T vrste Tr1, katerih poglavitni mehanizem imunosupresivnega delovanja temelji na izločanju IL-10. Nedavno tega so dokazali obstoj nove vrste tolerogenih DC *in vivo*. Poimenovali so jih DC-10, saj so ugotovili, da po aktiviranju proizvajajo velike količine IL-10 ter povzročijo nastanek perifernih regulatornih limfocitov T, in sicer na osnovi

vezave njihovih površinsko izraženih inhibitornih molekul ILT4 na molekule HLA-G.<sup>56</sup>

Tolerogene DC lahko nastanejo iz nezrelih DC pod specifičnimi imunosupresivnimi pogoji. Postopke za njihovo pripravo preučujemo predvsem v pogojih *in vitro*, pri čemer na kulture nezrelih DC vplivamo z dodatki različnih topnih dejavnikov, najpogosteje imunosupresivnih citokinov IL-10 ali TGF- $\beta$ .<sup>46-49</sup> Kot enako učinkovite pa so se za pripravo alternativno aktiviranih tolerogenih DC izkazale tudi različne farmakološke učinkovine z imunosupresivnimi lastnostmi in druge manjše molekule z ustreznim tolerogenim delovanjem, npr. kortikosteroidi in aktivni metabolit vitamina D<sub>3</sub>.<sup>50</sup> Tako smo v našem laboratoriju dokazali, da nezrele DC, ki smo jih gojili v prisotnosti niflumske kisline, nesteroidnega antirevmatika ali resveratrola, naravnega polifenola z izrazitimi antioksidativnimi lastnostmi, pridobijo izjemne tolerogene lastnosti, vključno s sposobnostjo indukcije regulatornih limfocitov vrste Tr1.<sup>51,52</sup>

### Naravno prisotni regulatorni limfociti T

Kot smo že omenili, naravno prisotni regulatorni limfociti Treg nastanejo v timusu iz dozorevajočih timocitov na osnovi preverjene vezave njihovih klonskih TCR na avtoantigene, predstavljene v okviru lastnih molekul HLA. Pri tem pa je zanimivo, da je še dopuščena vezavna afiniteta njihovih TCR na telesu lastne antigene nekaj večja kot v primeru dokončno izbranih zrelih naivnih limfocitov T. Na periferiji naravni Treg skrbijo za vzdrževanje specifične tolerance na posamezne, telesu lastne antigene.<sup>3,18</sup> Pomemben molekulski označevalec, ki ga uporabljamo za razlikovanje med naravnimi in periferno induciranimi regulatornimi limfociti T, je znotrajcelični transkripcijski dejavnik FoxP3. Ugotovili so namreč, da je ključnega pomena tako za nastanek Treg v timusu kakor tudi za njihovo delovanje na periferiji.<sup>57-59</sup> Dokazali so, da lahko različne mutacije v genu *foxp3* povzročijo nastanek hude bolezni IPEX (*angl.* Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy and X-linked inheritance).<sup>60</sup> To je redko,

zelo agresivno, recesivno podedovano patološko stanje, ki povzroči zgodnjo smrt bolnika zaradi razvoja številnih avtoimunskih bolezni, dodatnih imunskih zapletov, alergije na hrano, eozinofilije, atopičnega dermatitisa itd.<sup>61</sup> Razlog za tako hude posledice pa je nepravilno oziroma izničeno imunosupresivno delovanje ali celo odsotnost FoxP3<sup>+</sup> celic Treg.<sup>62</sup>

Glede na celični fenotip, ki ga ugotavljamo s pretočno citometrijo, ob uporabi, z različnimi fluorescenčnimi barvili označenih specifičnih monoklonskih detekcijskih protiteles opredelimo naravne celice Treg kot CD4<sup>+</sup>CD25<sup>visoko</sup>FoxP3<sup>+</sup> limfocit T. Ker pa FoxP3 ni zelo specifičen označevalec celic Treg, iščejo še dodatne molekulske markerje, s katerimi bi jih lahko natančneje določali. Med novejšje, dodatne označevalce sodita šibko izraženi receptor za IL-7 (CD127) in prisotnost transkripcijskega dejavnika Helios.<sup>63,64</sup> Močno izražanje CD25, verige  $\alpha$  receptorja za interlevkin 2 (IL-2), je zanimiva značilnost naravnih celic Treg, saj to molekulo v malo manjšem obsegu izražajo vsi aktivirani efektorski, ne pa tudi naivni limfociti T. Zato lahko prisotnost molekul CD25 uporabimo tudi kot dokaz za aktiviranje omenjenih imunskih celic.

### Mehanizmi imunosupresivnega delovanja naravnih celic Treg

Mehanizmi delovanja naravnih celic Treg so vezani na tesne medcelične stike z drugimi vrstami imunskih celic. Naravne celice Treg izjemno učinkovito zavirajo tako aktiviranje kot tudi proliferiranje efektorskih limfocitov T, poleg tega pa tudi proliferiranje limfocitov B, proizvodnjo imunoglobulinov ter menjavo imunoglobulinskih razredov.<sup>65-67,68,69</sup>

Zanje je značilno, da nenehno izražajo površinske inhibitorne molekule CTLA-4 (CD152), ki so receptorji za kostimulatorne molekule CD80 in CD86, prisotne na površinah APC.<sup>70</sup> Vezava molekul CD80 in CD86 na CTLA-4 sproži negativni signal, ki v notranjosti APC poveča aktivnost encima indolaminske-2,3-dioksidogeneze (IDO). Ta učinkovito razgrajuje aminokislino L-triptofan, ki je izjemno pomembna za pravilno

delovanje zlasti aktiviranih limfocitov T. Tako se z indukcijoIDO ustvari specifično mikrookolje z nizko koncentracijo triptofana, kar seveda močno zavira delovanje efektorskih limfocitov T.<sup>71</sup> Interakcija med CTLA-4 in molekulami CD80/CD86 pa naj bi še dodatno vplivala na APC, in sicer tako, da zmanjša stopnjo njihovega aktiviranja ter s tem omogoči nastanek induciranih tolerogenih APC. Te naj bi že same po sebi delovale imunosupresivno, poleg tega pa lahko preko medceličnih interakcij izzovejo tudi nastanek periferno induciranih regulatornih limfocitov T.<sup>72</sup> Eden od možnih mehanizmov delovanja naravnih regulatornih limfocitov Treg temelji na hkratni trojni interakciji med njimi, APC in efektorskimi limfociti T. Pri tem naj bi naravne celice Treg posredovale močne inhibitorne signale med APC in efektorske limfocite T ter tako učinkovito zavrle imunski odziv.<sup>73</sup> Naravne celice Treg lahko s posredovanjem inhibitornih signalov efektorskemu limfocitu, s katerimi so v tesnem stiku, povzročijo zvišanje njihovih znotrajceličnih ravni cikličnega adenzin monofosfata (cAMP), s tem pa preprečijo njihovo optimalno aktiviranje.<sup>74</sup>

Poleg inhibitornih molekul CTLA-4 naravne celice Treg konstitutivno izražajo tudi precejšnje količine membransko vezanega TGF- $\beta$ , ki je prav tako pomemben posrednik njihovega imunosupresivnega delovanja.<sup>75,69</sup> Nenazadnje pa lahko Treg povzročijo tudi smrt efektorskih limfocitov T, s katerimi reagirajo, in sicer z izločanjem grancima B in perforina, molekul, ki ju za uničevanje tarčnih celic sicer uporabljajo aktivirani CD8<sup>+</sup> citotoksični limfociti T.<sup>76,77</sup>

### Periferno inducirani regulatorni limfociti T

Način delovanja je tista značilnost, na osnovi katere lahko naravne celice Treg razlikujemo od tistih regulatornih limfocitov T, ki nastanejo na perifერიji. Za imunosupresivno učinkovanje slednjih namreč tesni medcelični stiki največkrat niso nujno potrebni. Omenili smo že, da lahko pridobljene oziroma inducirane regulatorne celice nastanejo le pod specifičnimi pogoji. Eden od teh je, da morajo priti naivni limfociti T v stik



z nezrelimi ali s tolerogenimi DC oziroma drugimi vrstami imunosupresivnih APC. Pri tem pa je pomembno tudi tkivno mikrookolje, v katerem do takšnih interakcij prihaja. Periferno inducirane regulatorne celice lahko nastanejo tako iz  $CD4^+$  kot  $CD8^+$  limfocitov T. V nadaljevanju se bomo osredotočili predvsem na periferno inducirane regulatorne celice vrst  $Tr1$  in  $FoxP3^+$ , saj sta obe celični vrsti dokazano prisotni v človeškem organizmu, poleg tega pa ju lahko bolj ali manj uspešno pripravimo tudi v pogojih *in vitro*. Slednje dejstvo predstavlja osnovo za njihovo potencialno uporabo pri zdravljenju določenih imunsko posredovanih bolezni, kar še posebej velja za limfocite  $Tr1$ .

### Regulatorni limfociti vrste $Tr1$

V nasprotju s celicami T pomagalkami (Th), regulatorni limfociti  $Tr1$  po aktiviranju ne izločajo  $IFN-\gamma$  in IL-4, temveč predvsem velike količine IL-10, v nekaterih primerih pa tudi  $TGF-\beta$ .<sup>78</sup> Limfociti  $Tr1$  so v nasprotju z efekorskimi celicami T izrazito anergični, kar pomeni, da zelo šibko proliferirajo v odzivu na specifično antigensko stimulacijo preko njihovih TCR. Mehanizem njihovega regulatornega delovanja temelji predvsem na izločanju IL-10 v nekaterih primerih tudi  $TGF-\beta$ , v mikrookolje. S tem lahko tako *in vitro* kot *in vivo* učinkovito zavrejo antigensko specifične imunske odzive naivnih, aktiviranih efekorskih in tudi spominskih limfocitov T.<sup>79-83</sup>

Interleukin-10 je klasični protivnetni citokin, ki je značilno prisoten v imunskih reakcijah vrste Th2. Zelo izrazito zavira številne imunske odzive v različnih eksperimentalnih modelih okužb in vnetnih stanj, enako pa deluje tudi pri raku, kjer maligno spremenjene celice aktivno ščiti pred imunskim napadom efekorskih limfocitov T<sup>87</sup>. Očitno je torej, da je IL-10 nosilec temeljnega mehanizma imunosupresivnega delovanja limfocitov  $Tr1$ . Pri tem pa ne zavira le aktiviranja in proliferacije limfocitov T, temveč tudi aktiviranje APC, ki se nahajajo v neposredni bližini vzpodbujenih celic  $Tr1$ .<sup>78</sup> Podobno kot IL-10 pa na stimulacijsko funkcijo APC deluje zaviralno tudi  $TGF-\beta$ , ki poleg tega zavira še proizvodnjo vnetnih

citokinov in proliferacijo efekorskih limfocitov T.<sup>88,89</sup> Ugotovili so tudi, da večkratna zaporedna stimulacija receptorjev TCR, izraženih na površinah naivnih limfocitov T, ob hkratnem dodajanju IL-10 omogoči njihovo diferenciacijo v celice  $Tr1$  *in vitro*.<sup>79</sup> Tudi aktivni metabolit vitamina D<sub>3</sub> in deksametazon, učinkovini z znanim imunosupresivnim delovanjem, lahko preko sprožitve avtokrine proizvodnje IL-10 v z njima obdelanih limfocitih T izzoveta njihovo pretvorbo v celice  $Tr1$  *in vitro*.<sup>80,90</sup> Zato ne preseneča dejstvo, da je prav prisotnost zadostnih količin IL-10 eden od osnovnih pogojev za nastanek limfocitov  $Tr1$  na periferiji.

### Inducirani $FoxP3^+$ regulatorni limfociti T

Dolgo časa je veljalo prepričanje, da je timus edini izvor  $FoxP3^+$  regulatornih celic T. V zadnjih nekaj letih pa so ugotovili, da lahko iz naivnih celic T pod različnimi pogoji tudi na obrobju, nastanejo  $FoxP3^+$  limfociti T, t. i. inducirane celice Treg.<sup>91-93</sup> Glede na različna mesta nastanka naravnih in induciranih  $FoxP3^+$  limfocitov Treg je logično, da se repertoarja njihovih antigenskih specifičnosti med seboj razlikujeta. Naravne celice Treg lahko namreč specifično prepoznajo le tiste avtoantigene, s katerimi so bile v stiku med svojim razvojem v timusu medtem ko se periferno inducirani limfociti Treg najverjetneje specifično odzivajo tako na lastne kot na tuje antigene, ki so prisotni v sekundarnih limfatičnih tkivih.<sup>92,94</sup>

Obe vrsti celic sta si fenotipsko zelo podobni, saj poleg transkripcijskega dejavnika  $FoxP3$ , sočasno izražata tudi molekule CD4 in CD25. Za razliko od naravnih celic Treg, pri katerih sta izražanje in aktivnost  $FoxP3$  ključna za njihovo delovanje, pa do sedaj še niso uspeli pojasniti, kako pomembno vlogo igrata v človeških induciranih celicah Treg, saj nista vedno povezana z njihovo imunosupresivno funkcijo. Poleg tega pa se moramo zavedati že omenjenega dejstva, da pri človeku tudi aktivirani efekorski  $CD4^+$  limfociti T izražajo  $FoxP3$ , vendar pa so za razliko od naravnih celic Treg tega sposobni le prehodno.<sup>95</sup>

Pogoji, ki omogočajo nastanek induciranih celic Treg, se razlikujejo od tistih, ki so potrebni za razvoj regulatornih limfocitov Tr1, pri čemer pa jih še niso uspeli v celoti pojasniti. Zaenkrat vemo le to, da je za pretvorbo naivnih CD4<sup>+</sup> limfocitov T v inducirane FoxP3<sup>+</sup> celice Treg poleg ustreznega antigeneskega stimuliranja njihovih TCR nujno potrebna tudi prisotnosti citokinov IL-2 in TGF-β.<sup>96</sup>

Poglavitne razlike med naravno prisotnimi in periferno induciranimi limfociti Treg so torej izražene v njihovih antigenih specifičnostih ter v dražljajih, ki so potrebni za njihov nastanek. Po drugi strani pa so si mehanizmi delovanja obeh vrst celic med seboj precej podobni, zlasti kar se tiče proizvodnje imunosupresivnih citokinov. Tipičen primer sta tako membransko vezana kakor tudi topna oblika TGF-β, ki jo proizvajata obe vrsti celic Treg. Omenjeni citokin je namreč pomemben posrednik njihovega imunosupresivnega delovanja.<sup>97</sup> Ugotovili pa so tudi, da lahko periferno inducirani limfociti Treg poleg tega proizvajajo še IL-10, kar jim omogoča izvajanje od TGF-β neodvisne imunosupresivne dejavnosti.<sup>98</sup>

## Zaključek

Imunska toleranca je pomemben del homeostaze človeškega organizma, ki skrbi za nadzor in uravnavanje reaktivnosti našega imunskega sistema. Podrobno poznavanje kompleksnih procesov, signalizacijskih poti ter vloge posameznih, predvsem celičnih komponent imunskega sistema, ki skupaj vzdržujejo razmeroma robustno, a kljub temu ranljivo ravnotežje med efektorskim in regulatornim delom naše imunosti, je nujna osnova za razvoj novih načinov zdravljenja imunske pogojenih bolezni, s katerimi bi lahko učinkovito nadomestili dosedanje, pretežno simptomatske terapevtske pristope. Regulatorni limfociti T in tolerogene APC, zlasti dendritične celice, so v zadnjem desetletju pritegnili izjemno zanimanje številnih raziskovalcev. Zato se zelo hitro kopiči znanje o njihovem pomenu in funkcijah, tako v okviru fizioloških kot patoloških stanj, poleg tega pa tudi o mehanizmih njihovega nastajanja *in vitro* oziroma *in vivo*.

Na tej osnovi potekajo tudi intenzivna prizadevanja za čim prejšnjo uvedbo naprednega zdravljenja z regulatornimi limfociti T, in sicer v obliki celičnih terapij zlasti tistih avtoimunskih bolezni, pri katerih poznamo vsaj nekaj specifičnih avtoantigenov, pa tudi za preprečevanja zavrinitvenih reakcij po alogenskih presaditvah tkiv in organov. Tako trenutno že potekajo posamezne klinične študije, v katerih preizkušajo predvsem varnost in uporabnost celičnih terapevtskih pripravkov.<sup>99</sup>

## Literatura

1. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80: 695–705.
2. Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 833–44.
3. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775–87.
4. Cantor H, Weissman I. Development and function of subpopulations of thymocytes and T lymphocytes. *Prog Allergy* 1976; 20: 1–64.
5. Stutman O. Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol Rev* 1978; 42: 138–84.
6. Bhan AK, Reinherz EL, Poppema S, McCluskey RT, Schlossman SF. Location of T cell and major histocompatibility complex antigens in the human thymus. *J Exp Med* 1980; 152: 771–82.
7. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 107–16.
8. Ebert PJ, Li QJ, Huppa JB, Davis MM. Functional development of the T cell receptor for antigen. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 92: 65–100.
9. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 195–205.
10. Nitta T, Nitta S, Lei Y, Lipp M, Takahama Y. CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 17129–33.
11. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002; 298: 1395–401.
12. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 350–4.
13. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 2007; 316: 295–8.

14. Alt FW, Oltz EM, Young F, Gorman J, Taccioli G, Chen J. VDJ recombination. *Immunol Today* 1992; 13: 306–14.
15. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 767–77.
16. Allman DM, Ferguson SE, Lentz VM, Cancro MP. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol* 1993; 151: 4431–44.
17. Melchers F, Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Ghia P, et al. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 214–27.
18. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345–52.
19. Niederkorn JY. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol* 2006; 7: 354–9.
20. Meinhardt A, Hedger MP. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 335: 60–8.
21. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 10–6.
22. Weaver CT, Unanue ER. The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunol Today* 1990; 11: 49–55.
23. Chesnut RW, Grey HM. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J Immunol* 1981; 126: 1075–9.
24. Schultze JL, Michalak S, Seamon MJ, Dranoff G, Jung K, Daley J. CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* 1997; 100: 2757–65.
25. Kurt-Jones EA, Liano D, HayGlass KA, Benacerraf B, Sy MS, Abbas AK. The role of antigen-presenting B cells in T cell priming in vivo. Studies of B cell-deficient mice. *J Immunol* 1988; 140: 3773–8.
26. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767–811.
27. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 610–21.
28. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685–711.
29. Steinman RM. Lasker Basic Medical Research Award. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med* 2007; 13: 1155–9.
30. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863–9.
31. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 782–7.
32. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154: 5071–9.
33. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001; 106: 263–6.
34. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192: 1213–22.
35. Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ, Jenkins CD, et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 2000; 191: 435–44.
36. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191: 411–6.
37. Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, Piazza F, Yarinina A, Cortesini R, et al. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003; 11: 245–58.
38. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002; 3: 237–43.
39. Ristich V, Liang S, Zhang W, Wu J, Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1133–42.
40. Adler HS, Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol* 2007; 17: 476–91.
41. Liang S, Horuzsko A. Mobilizing dendritic cells for tolerance by engagement of immune inhibitory receptors for HLA-G. *Hum Immunol* 2003; 64: 1025–32.
42. Lange C, Durr M, Doster H, Melms A, Bischof F. Dendritic cell-regulatory T-cell interactions control self-directed immunity. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 575–81.
43. Hackstein H, Morelli AE, Thomson AW. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol* 2001; 22: 437–42.
44. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 2006; 108: 1435–40.
45. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445–9.
46. Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159: 4772–80.
47. Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999; 93: 1634–42.
48. Belladonna ML, Volpi C, Bianchi R, Vacca C, Orabona C, Pallotta MT, et al. Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-

- competent dendritic cells. *J Immunol* 2008; 181: 5194–8.
49. Yarilin D, Duan R, Huang YM, Xiao BG. Dendritic cells exposed in vitro to TGF- $\beta$ 1 ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 214–9.
  50. Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004; 16: 127–34.
  51. Svajger U, Vidmar A, Jeras M. Niflumic acid renders dendritic cells tolerogenic and up-regulates inhibitory molecules ILT3 and ILT4. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 997–1005.
  52. Svajger U, Obermajer N, Jeras M. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. *Immunology* 2010; 129: 525–35.
  53. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol* 1999; 73: 153–264.
  54. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207–14.
  55. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2: 725–31.
  56. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010; 116: 935–44.
  57. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330–6.
  58. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 2008; 28: 870–80.
  59. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007; 8: 457–62.
  60. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27: 20–1.
  61. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002; 39: 537–45.
  62. Torgerson TR, Linane A, Moes N, Anover S, Mateo V, Rieux-Laucat F, et al. Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology* 2007; 132: 1705–17.
  63. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701–11.
  64. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184: 3433–41.
  65. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531–62.
  66. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 2001; 167: 1137–40.
  67. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10: 1969–80.
  68. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175: 4180–3.
  69. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, et al. TGF- $\beta$  1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 2004; 172: 834–42.
  70. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007; 13: 108–16.
  71. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176: 6752–61.
  72. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172: 4676–80.
  73. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10398–403.
  74. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmeshofer A, Serfling E, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007; 204: 1303–10.
  75. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- $\beta$ -dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202: 1075–85.
  76. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Nolle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 2005; 174: 1783–6.
  77. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; 27: 635–46.
  78. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levinger MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28–50.



79. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737–42.
80. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; 195: 603–16.
81. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, et al. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1994; 179: 493–502.
82. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001; 166: 5530–9.
83. Veldman C, Hohne A, Dieckmann D, Schuler G, Hertl M. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J Immunol* 2004; 172: 6468–75.
84. Mahic M, Henjum K, Yaqub S, Bjornbeth BA, Torgersen KM, Tasken K, et al. Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur J Immunol* 2008; 38: 640–6.
85. Colovai AI, Mirza M, Vlad G, Wang S, Ho E, Cortesini R, et al. Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 2003; 64: 31–7.
86. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* 2004; 200: 1123–34.
87. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* 2008; 226: 205–18.
88. Strobl H, Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect* 1999; 1: 1283–90.
89. Cerwenka A, Swain SL. TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes Infect* 1999; 1: 1291–6.
90. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172: 5986–93.
91. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 2002; 196: 851–7.
92. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004; 199: 1401–8.
93. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, et al. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004; 172: 6003–10.
94. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 2005; 115: 1923–33.
95. Roncarolo MG, Gregori S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *Eur J Immunol* 2008; 38: 925–7.
96. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30: 626–35.
97. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*. 2006; 25: 455–71.
98. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol*. 2004; 172: 5213–21.
99. Martinuĉ M, Jeras M. Immunoregulatory properties of bone marrow stem cells and their potential use in solid organ transplantation. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 354–61