

Komórki regulatorowe z populacji limfocytów CD8⁺

TOMASZ MAŚLANKA

Katedra Farmakologii i Toksykologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie,
ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Maślanka T.

CD8⁺ Regulatory cells

Summary

Regulatory T cells are heterogeneous with sub-populations which differ from each other in their phenotype, immune inhibitory mechanisms and functioning. These cells are responsible for regulation of immune response and play a leading role in developing immune tolerance through active suppression. Suggested functions for regulatory T cells include: prevention of autoimmune diseases by maintaining self-tolerance, oral tolerance and, moreover, suppression of allergy and pathogen-induced immunopathology. CD4⁺ regulatory cells, such as Treg, Tr1 and Th3, are the most comprehensively studied and characterized regulatory lymphocytes; however, in recent years substantial progress has been made in the phenotypic and functional characterization of CD8⁺ regulatory cells. These cells can be divided into two general groups: natural and induced lymphocytes. Natural regulatory cells develop in the thymus, constitute a stable lineage, while their induced counterparts are generated under experimental conditions and may or may not have stable phenotypes. Both types of these cells can be subdivided into several phenotypic groups. The author reviews the current state of knowledge concerning the best-characterized human and murine CD8⁺ regulatory lymphocytes, i.e., CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺, CD8⁺CD122⁺ and CD8⁺CD28⁻ cells. This paper focuses on aspects concerning the phenotype and phenotypic markers of these cells, as well as their immune inhibitory mechanisms.

Keywords: regulatory cells, tolerance, CD8⁺, Foxp3, CD122, CD28

Już 35 lat temu opisywano komórki supresorowe, które wykazywały ekspresję cząsteczki CD8, ale w związku z brakiem odpowiednich narzędzi badania nad tym zagadnieniem zostały zawieszone na długie lata. Biorąc pod uwagę rosnącą liczbę publikacji w ostatnich 10 latach, które traktują o tym temacie, można powiedzieć za Filaci i Suci-Foca (11), że komórki te „wróciły do gry”. Zaproponowano podział limfocytów regulatorowych CD8⁺ na trzy typy (11). Typ pierwszy to komórki o fenotypie CD8⁺CD28⁻, których działanie opiera się na redukcji ekspresji cząsteczek kostymulujących na komórkach prezentujących antygen (APC) i jest zależne od kontaktu komórka-komórka. Typ drugi to również limfocyty o fenotypie CD8⁺CD28⁻, ale ich działanie nie jest zależne od kontaktu z APC, lecz odbywa się poprzez produkcję IFN- γ i IL-6. Typ trzeci, zdaniem autorów, nie posiada zdefiniowanego fenotypu, a działanie regulatorowe jest realizowane za pośrednictwem sekrecji IL-10. Podział ten jednak wydaje się nieprzystający do obecnego stanu wiedzy i wymaga reorganizacji. Pomiń i wsp. (28) zaproponowali podział limfocytów regulatorowych CD8⁺ na naturalne i indukowane (adaptacyjne), i opierając się na dostępnych wynikach badań, do każdej z tych grup przyporządkowali różne grupy fenotypowe limfocytów CD8⁺, w stosunku do których wykazano działanie supresorowe/regulatorowe.

Wśród naturalnie występujących limfocytów CD8⁺ można wyróżnić komórki o fenotypie CD8⁺CD122⁺ (7, 31), CD8⁺CD28⁻ (26), CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ (1, 5) i jelitowe CD8⁺ $\alpha\alpha$ ⁺ (29), zaś wśród komórek indukowanych limfocytów o fenotypie CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ (25), CD8⁺Foxp3⁺ (13, 18), CD8⁺CD28⁻ (3, 15, 23), CD8⁺CD75^s (43), CD8⁺CD11c⁺ (34) i CD8⁺ $\alpha\alpha$ ⁺ (41). To przyporządkowanie należy traktować raczej jako zestawienie współczesnej wiedzy o fenotypach komórek regulatorowych z populacji CD8⁺ niż jako ich ścisłą klasyfikację, gdyż przy obecnym stanie wiedzy nie można wykluczyć, że niektóre z tych grup komórek nie stanowią odrębnych populacji, lecz pokrywają się ze sobą. W dalszej części pracy scharakteryzowane zostaną najlepiej poznane limfocyty regulatorowe CD8⁺.

Limfocyty regulatorowe o fenotypie CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ i CD8⁺Foxp3⁺

W 2003 r. Cosmi i wsp. (5) wykazali obecność limfocytów o fenotypie CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ w grasicach dzieci. Limfocyty te łączy szereg podobieństw z nTreg (naturalnie występujące komórki regulatorowe o fenotypie CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺): oba typy komórek są obecne w tych samych obszarach grasicy, ale, co ważniejsze, konstytutywnie wykazują ekspresję mRNA dla Foxp3 (czynn timeranskrypcyjny stanowiący regulator rozwoju i funkcji

komórek Treg), jak i GITR (receptor czynnika martwicy nowotworu), a ponadto ujawniają tylko śladową, o ile w ogóle, proliferację w odpowiedzi na allogeniczną stymulację. Opisywane komórki wykazywały dawkowo zależne działanie supresorowe na allogeniczną odpowiedź autologicznych limfocytów $CD4^+CD25^-$ i $CD8^+CD25^-$. Należy też podkreślić, że te grasiczne komórki regulatorowe nie ujawniały obecności cytotoksycznych cząsteczek efektorowych (perforyny i granzym A), a ponadto poliklonalna stymulacja nie wywołała wydzielania jakichkolwiek cytokin, ale indukowała na powierzchni komórek ekspresję CTLA-4 (antygen-4 związany z limfocytym T cytotoksycznym) i mTGF- β (transformujący czynnik wzrostu; mTGF- β – postać związana z błoną komórkową). W przytaczanych badaniach wykazano, że mechanizm supresorowego działania limfocytów $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ zależy od kontaktu komórka–komórka i jest związany ze zdolnością tych limfocytów do regulacji w dół ekspresji cząsteczki CD25 (łańcuch α receptora IL-2) na komórkach efektorowych, czyniąc je w ten sposób niewrażliwymi na działanie IL-2. W działanie to zaangażowane są CTLA-4 i mTGF- β , gdyż ich blokowanie powodowało zniesienie regulatorowego oddziaływania. Biorąc powyższe pod uwagę, można powiedzieć, że wyniki badań Cosmi i wsp. (5) ujawniły w organizmie człowieka obecność naturalnie występujących limfocytów regulatorowych o fenotypie $CD8^+CD25^+Foxp3^+$, które pod wieloma względami przypominają nTreg. Wyniki badań Correale i Villa (4) opublikowane w 2010 r. potwierdzają istnienie takich komórek u człowieka i wskazują, że defekty w zakresie ich funkcji mogą prowadzić do indukcji reakcji autoimmunologicznych, w tym stwardnienia rozsianego. W badaniach tych potwierdzono, że działanie regulatorowe limfocytów $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ jest zależne od ich kontaktu z komórkami docelowymi. W przeciwieństwie jednak do wyników uzyskanych przez Cosmi i wsp. (5), w działanie to wydają się również zaangażowane IL-10 i TGF- β (rozpuszczalna forma), gdyż obserwowano dużą produkcję tych cytokin przez oceniane komórki. Badania Correale i Villa (4) wykazały ponadto, że ważnym, o ile nie kluczowym, elementem składającym się na mechanizm regulatorowego oddziaływania limfocytów $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ jest indukcja tolerogennych komórek dendrytycznych (DC) w wyniku aktywacji immunosupresyjnego czynnika transkrypcyjnego STAT3 (przekaznik sygnału i aktywator transkrypcji) w tych komórkach. Aktywacja STAT3 powodowała regulację w dół cząsteczek kostymulujących na DC, jak również zwiększała w nich ekspresję IDO (indoloamino-2,3-dioksygenaza – enzym degradujący tryptofan), tak jak czynią to limfocyty $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Powyższe badania wskazują więc na wielokierunkowość sposobu działania opisywanych komórek. U myszy wykazano również obecność naturalnych limfocytów regulatorowych $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ (1). Należy jednak zwrócić uwagę, że poza wyżej przytoczonymi wynikami badań (1, 4, 5) brak jest w dostępnej literaturze danych na temat naturalnego występowania tych komórek, dlatego też ich rola nie została ustalona. Obecnie przyjmuje się,

że limfocyty te są zaangażowane w utrzymanie tolerancji wobec własnych tkanek oraz że biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej m.in. wobec patogenów czy komórek nowotworowych (24).

Niezależnie od naturalnego występowania limfocytów regulatorowych $CD8^+CD25^+Foxp3^+$, komórki o takim typie i funkcji mogą być również indukowalne (25, 38). Mahic i wsp. (25) wykazali możliwość generowania u człowieka indukowanych limfocytów regulatorowych $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ z komórek $CD8^+CD25^-$ w wyniku ich długotrwałej stymulacji antygenowej. Limfocyty te produkowały IL-10, TGF- β i prostaglandynę E2, ale nie wydaje się, aby miało to wiodące znaczenie w ich działaniu hamującym proliferację i wydzielanie cytokin przez limfocyty efektorowe, gdyż proces ten zależał od kontaktu komórka–komórka. Intrygującym jest fakt, że limfocyty te nie tylko nie wpływały na cytotoksyczne cząsteczki efektorowe w limfocytach $CD8^+$, lecz same wykazywały ich ekspresję, co, zdaniem autorów, ma dowodzić dwójakiej natury komórek $CD8^+CD25^+Foxp3^+$, tj. współistnienia funkcji efektorowej i regulatorowej.

W 2007 r. (38) ukazały się wyniki interesujących badań, w których ujawniono ważną rolę indukowanych limfocytów $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ w utrzymaniu statusu immunologicznego uprzywilejowania (immune privilege) oka, a więc w ochronie jego delikatnych struktur i narządów przed niejednokrotnie niszczącym wpływem stanu zapalnego. Jednym z elementów odpowiedzialnych za utrzymanie tego statusu jest nabłonek barwnikowy tęczówki (IPE, iris pigment epithelium), m.in. ze względu na to, że bierze udział w utrzymaniu integralności bariery krew/oko. Niezależnie od tego, we wzmiankowanych powyżej badaniach Sugita i wsp. (38) wykazali, że IPE, najprawdopodobniej za pośrednictwem mTGF- β , indukował konwersję limfocytów $CD8^+CD25^-Foxp3^-$ do komórek regulatorowych o fenotypie $CD8^+CD25^+Foxp3^+$, które produkowały IL-10 i TGF- β i wykazywały właściwości supresorowe wobec limfocytów efektorowych. Limfocyty efektorowe $CD8^+$, aby znaleźć się w cieczy wodnistej komórki oka, po opuszczeniu naczyń krwionośnych tęczówki i dostaniu się do jej zrębu muszą przeniknąć poprzez IPE. Sugita i wsp. (38) postulują, że na tym etapie komórki nabłonka barwnikowego tęczówki w sposób zależny od kontaktu komórka–komórka (tj. zachodzący z udziałem mTGF- β i cząsteczek kostymulujących serii B7 obecnych na ich powierzchni) indukują konwersję efektorowych limfocytów $CD8^+$ do komórek regulatorowych $CD8^+CD25^+Foxp3^+$. Limfocyty te mają wywierać niespecyficzne działanie supresorowe za pośrednictwem produkcji TGF- β i w ten sposób brać aktywny udział w powstawaniu i utrzymaniu statusu immunologicznego uprzywilejowania przedniego odcinka oka. Zaliczanie tych limfocytów w poczet „indukowanych” może być dyskusyjne, gdyż nie powstają w organizmie w odpowiedzi na stymulację antygenową, jakkolwiek do takich zostały przyporządkowane przez Pomié i wsp. (28). Na ten niezwykły status immunologiczny narządu wzroku składa się również zjawisko immunologicznej od-

mienności komory przedniej oka (ACAID, anterior chamber-associated immune deviation), które jest formą lokalnej i obwodowej tolerancji immunologicznej, powstającej w odpowiedzi na antygen wprowadzony do przedniej komory oka i utrzymywanej przez antygenowo specyficzne limfocyty regulatorowe, m.in. przez komórki Treg i limfocyty $\gamma\delta^+$. ACAID jest zjawiskiem niezwykle korzystnym, gdyż zmniejsza ryzyko wystąpienia wewnątrzgałkowych zapaleń, u podłoża których leżą nieprawidłowe reakcje immunologiczne oraz poprawia przeżycie przeszczepu rogówki (27). Wyniki badań Jianga i wsp. (16) sugerują, że również limfocyty o fenotypie $CD8^+Foxp3^+$ stanowią grupę komórek regulatorowych zaangażowanych w wywołanie i utrzymanie ACAID, ale w odróżnieniu od komórek opisywanych przez Sugitę i wsp. (38) komórki te są indukowane przez antygen, a supresja przez nie wywoływana jest antygenowo swoista. Za indukowane limfocyty regulatorowe można również uznać komórki o fenotypie $CD8^+Foxp3^+$ opisane przez Kappę i wsp. (18) i Hahna i wsp. (13). Wyniki uzyskane przez pierwszą grupę badaczy (18) wskazują na możliwość generowania antygenowo specyficznie działających komórek regulatorowych $CD8^+Foxp3^+$ oraz pozwalają przypuszczać, że mogą brać one udział w indukcji tolerancji transplantacyjnej. Splenocyty uzyskane od transgenicznym myszy Rag-/- (brak dojrzałych limfocytów T i B) z receptorem TCR swoistym wobec albuminy jaja kurzego (OVA, owalbumina) aktywowano w obecności lub nieobecności TGF- β z użyciem APC, które wykazywały ekspresję OVA. W obecności tej cytokiny dochodziło do indukcji limfocytów $CD8^+Foxp3^+$, które w sposób zależny od APC hamowały aktywność OVA-specyficznych limfocytów cytotoksycznych oraz proliferację OVA-specyficznych komórek $CD4^+$. W badaniach tych stwierdzono również, że TGF- β jest niezbędny do wygenerowania limfocytów $CD8^+Foxp3^+$, ale podobnie jak IL-10, nie bierze bezpośredniego udziału w regulatorowym działaniu tych komórek. Wyniki innych badań (13) wskazują na rolę indukowanych limfocytów $CD8^+Foxp3^+$ produkujących TGF- β w hamowaniu reakcji autoimmunologicznych w mysim modelu tocznia rumieniowatego.

Z powyższych danych wynika, że stan wiedzy na temat komórek regulatorowych $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ i $CD8^+Foxp3^+$ jest stosunkowo niewielki, szczególnie w porównaniu do Treg i nie uprawnia do wyprowadzania generalnych konkluzji na ich temat. Wydaje się, że przytaczane wyniki badań należy traktować z pewną ostrożnością do czasu, kiedy obecność, rola i sposób działania tych komórek nie zostaną gruntownie przebadane, ustalone i potwierdzone, tak jak ma to miejsce w przypadku limfocytów regulatorowych o fenotypie $CD4^+CD25^+Foxp3^+$.

Limfocyty regulatorowe o fenotypie $CD8^+CD122^+$ i $CD8^+CXCR3^+$

W 1995 r. Suzuki i wsp. (39) wykazali, że u myszy pozbawionych cząsteczki CD122, czyli łańcucha β receptora dla IL-2, dochodziło do nadaktywności układu

immunologicznego, wzmożonej granulopoezy i upośledzonej erytropoezy. Ciężka anemia prowadziła do śmierci zwierząt w czasie pierwszych 3-4 miesięcy życia. Rifa'i i wsp. (31) stwierdzili, że adoptywny transfer limfocytów $CD8^+CD122^+$ myszom pozbawionym cząsteczki CD122 normalizował te zaburzenia i zapobiegał śmierci zwierząt. Wykazano ponadto, że wprowadzenie do myszy transgenicznym Rag-/- limfocytów $CD8^+CD122^-$ prowadziło do ciężkiej anemii i granulocytozy, a następnie śmierci zwierząt. Wyniki tych badań wskazywały, że przy braku komórek $CD8^+CD122^+$ limfocyty $CD8^+CD122^-$ ulegają spontanicznej aktywacji, prowadzącej do wyżej wymienionych zaburzeń. Uzyskane rezultaty pozwoliły na sformułowanie wniosku, że subpopulacja limfocytów $CD8^+CD122^+$ stanowi pulę naturalnych komórek regulatorowych, co zostało w późniejszym czasie potwierdzone i dokładniej zbadane (7, 32, 36). Komórki te zmniejszają produkcję IFN- γ przez docelowe, tj. już zaktywowane limfocyty $CD4^+$ i $CD8^+$ oraz hamują ich proliferację. Rozpoznanie komórek docelowych ma miejsce za pośrednictwem konwencjonalnej interakcji między kompleksem MHC klasy I a receptorem TCR (32) oraz kostymulującej interakcji między receptorem CD28 i jego ligandami CD80/CD86 (36), bez udziału APC, co odróżnia opisywane komórki od limfocytów regulatorowych o fenotypie $CD4^+CD25^+$ (31, 32, 36). Limfocyty $CD8^+CD122^+$ po rozpoznaniu komórek docelowych stają się aktywnymi limfocytami regulatorowymi produkującymi IL-10. W badaniach *in vitro* bezspornie udowodniono udział IL-10 w mechanizmie ich supresorowego oddziaływania (31, 32, 36). Nie wiadomo natomiast, w jaki sposób limfocyty te wywierają swoje działanie na komórki docelowe *in vivo*; przypuszcza się, że mogą być w to zaangażowane mechanizmy inne niż sekrecja IL-10 (7, 32).

Na pojawiające się pytanie, czy komórki regulatorowe o fenotypie $CD8^+CD122^+$ pozostają w związku/zależnościach z limfocytami Treg, nie można odpowiedzieć przy dzisiejszym stanie wiedzy. Zakłada się jednak, że obie grupy komórek zgodnie współdziałają w utrzymaniu immunologicznej homeostazy. Należy też zwrócić uwagę, że limfocyty regulatorowe o fenotypie $CD8^+CD122^+$ działają na już zaktywowane komórki docelowe, co sugeruje, że „włączają się” w późnej fazie reakcji immunologicznej, biorąc raczej udział w wygaszaniu burzliwie przebiegających reakcji immunologicznych niż w hamowaniu specyficznych odpowiedzi immunologicznych, obejmujących procesy autoimmunologiczne (32).

Fenotyp $CD8^+CD122^+$ jest podobnie problematyczny jak $CD4^+CD25^+$ w przypadku Treg. Cząsteczka CD122 (łańcuch β receptora dla IL-2) stanowi niejako odpowiednik cząsteczki CD25 (łańcuch α receptora dla IL-2), a więc pozwala na identyfikację subpopulacji komórek, w obrębie których znajdują się limfocyty o właściwościach regulatorowych, lecz nie stanowi ich swoistego markera. Wiele typów komórek wykazuje ekspresję cząsteczki CD122, a co ważniejsze, zanim odkryto właściwości regulatorowe limfocytów $CD8^+CD122^+$, komórki o takim fenotypie uznawane były i nadal są,

za limfocyty pamięci (40). Pojawia się więc pytanie, jakie komórki naprawdę obejmuje subpopulacja $CD8^+CD122^+$? Suzuki i wsp. (40) wskazali na dwa kierunki działań, które można podjąć, aby ustalić tę kwestię: należy znaleźć marker pozwalający różnicować oba typy komórek lub zweryfikować hipotezę zakładającą, że u myszy limfocyty o fenotypie $CD8^+CD122^+$ wykazują dualną naturę, a więc w zależności od ilościowości mogą zachowywać się jak komórki regulatorowe bądź jak centralne limfocyty pamięci. U myszy możliwe jest różnicowanie efektorowych komórek pamięci od limfocytów regulatorowych, gdyż te pierwsze charakteryzuje niska ekspresja CD62L (L-selektyna – receptor zasiedlania) (40), natomiast nie jest możliwe zastosowanie tego markera dla rozdziału komórek regulatorowych od centralnych limfocytów pamięci, gdyż oba typy komórek wykazują wysoką ekspresję CD64L ($CD8^+CD122^+CD64L^+$). Wyniki badań opublikowanych w 2010 r. zdają się rozwiązywać tę problematyczną kwestię. Dai i wsp. (6) odkryli, że komórki z subpopulacji $CD8^+CD122^+$ wykazujące ekspresję receptora PD-1 (programmed death-1 receptor) posiadają właściwości regulatorowe, natomiast limfocyty pozbawione tego receptora są komórkami pamięci. W badaniach tych potwierdzono udział IL-10 w regulatorowym oddziaływaniu komórek $CD8^+CD122^+PD-1^+$, lecz również wykazano, że działanie to jest zależne od $PD-1^+$, ponieważ zablokowanie tego receptora znosiło supresję proliferacji komórek docelowych. Wyniki tych badań potwierdziły więc, że subpopulacja o fenotypie $CD8^+CD122^+$ obejmuje dwie odrębne pod względem czynnościowym grupy komórek. Sugerowałoby to, że korelacja między występowaniem cząsteczki CD122 i właściwości regulatorowych limfocytów $CD8^+$ jest przypadkowa, co jednak nie wydaje się słuszne. Faktem jest, że w sposób bezpośredni nie udowodniono powiązania molekuly CD122 z powstawaniem i/lub utrzymywaniem tych właściwości, lecz pośrednio wskazuje na to nadaktywność układu immunologicznego u myszy pozbawionych tej cząsteczki. Świadczą o tym również wyniki badań uzyskanych przez Lee i wsp. (19). Badacze ci wykazali bowiem, że blokowanie cząsteczki CD122 u myszy cierpiących na autoimmunizacyjne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis), stanowiące zwierzęcy model stwardnienia rozsianego (MS, multiple sclerosis), wydłużało istotnie czas trwania objawów EAE. Wykazano ponadto, że adoptywny transfer limfocytów $CD8^+CD122^+$ w okresie największego nasilenia objawów klinicznych istotnie je redukował, wskazując na ważną rolę tych komórek w fazie zdrowienia. Uzyskane wyniki pozwalają mieć nadzieję, że limfocyty te mogą stać się w przyszłości użytecznym narzędziem klinicznym w kontrolowaniu zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego na podłożu autoimmunologicznym, jak np. MS.

Limfocyty regulatorowe o fenotypie $CD8^+CD122^+$ nie pokrywają się z charakteryzowanymi wcześniej komórkami regulatorowymi $CD8^+CD25^+Foxp3^+$ i $CD8^+Foxp3^+$, gdyż nie wykazano w ich obrębie ekspresji Foxp3 (31).

Limfocyty regulatorowe o fenotypie $CD8^+CD122^+$ nie zostały wykryte w organizmie człowieka, co wyraźnie nurtowało badaczy, którzy odkryli te komórki u myszy. Zakładali oni bowiem, że skoro są nieodzowne dla utrzymania homeostazy immunologicznej organizmu myszy, to powinny posiadać swoje „ludzkie odpowiedniki”, dlatego też podjęli badania, mające za cel ich identyfikację (35). Porównanie profilu ekspresji genów w obrębie subpopulacji mysich limfocytów o fenotypach $CD8^+CD122^+$ i $CD8^+CD122^-$ ujawniło preferencyjną ekspresję receptora chemokinowego CXCR3 przez pierwszą subpopulację. W kolejnym etapie badań oceniano limfocyty człowieka o fenotypie $CD8^+CXCR3^+$ pod kątem obecności aktywności regulatorowej i stwierdzono, że taką aktywność posiadają. Komórki te, na podobieństwo limfocytów $CD8^+CD122^+$, produkowały IL-10 i wykazywały działanie hamujące na syntezę IFN- γ przez komórki $CD8^+CXCR3^-$. Dlatego też autorzy przytaczanych badań postulują, aby uznać limfocyty człowieka o fenotypie $CD8^+CXCR3^+$ za odpowiednik mysich komórek regulatorowych $CD8^+CD122^+$. Nie zostało ustalone, czy współwystępowanie receptora CXCR3 i właściwości regulatorowych pozostaje ze sobą w związku, czy też jest to dzieło przypadku. Pozbawienie myszy cząsteczki CD122 prowadziło do śmierci zwierząt, podczas gdy brak receptora CXCR3 nie miał takich następstw, co sugerowałoby brak jego powiązania z działaniem regulatorowym. Shi i wsp. (35) próbują jednak bronić tezy, że receptor CXCR3 może być zaangażowany w to działanie, wskazując na to, że u myszy $CXCR3^{-/-}$, u których wywołano EAE, dochodziło do wydłużenia czasu występowania objawów klinicznych choroby. Sprawę komplikuje dodatkowo fakt, że receptor CXCR3 występuje również na komórkach efektorowych, bierze udział w migracji i rozmieszczeniu limfocytów $CD8^+$ oraz ma odgrywać kluczową rolę w wywoływaniu ostrego odrzutu przeszczepu (14). Na pytanie o jednolitość czynnościową ludzkich limfocytów o fenotypie $CD8^+CXCR3^+$, Shi i wsp. (35) odpowiadają w analogiczny sposób, jak uczynili to w odniesieniu do mysich komórek $CD8^+CD122^+$: albo ta subpopulacja obejmuje dwie odrębne pod względem czynnościowym grupy komórek, tj. regulatorowe i efektorowe, lecz brak swoistych markerów uniemożliwia ich różnicowanie, albo limfocyty wchodzące w jej skład mają podwójną naturę, a więc mogą się zachowywać zarówno jak komórki regulatorowe, jak i efektorowe. Należy mieć nadzieję, że w najbliższym czasie zostaną podjęte prace badawcze wyjaśniające/rozstrzygające tę kwestię.

Limfocyty regulatorowe o fenotypie $CD8^+CD28^-$

Do najwcześniejszych doniesień, zawierających wiarygodne dane na temat regulatorowego działania komórek z subpopulacji $CD8^+CD28^-$, należy praca Freedmana i wsp. z 1991 r. (12), w której autorzy opisali supresorowe zachowanie takich limfocytów człowieka. Jednak dopiero badania Najafiana i wsp. (26) prowadzone na myszach przyniosły przekonujące dowody na regulatorową/supresorową rolę limfocytów o fenotypie

CD8⁺CD28⁻, jak również na ich udział w mysim modelu choroby autoimmunizacyjnej. Wykazano, że myszy nie posiadające cząsteczek CD28 są naturalnie niewrażliwe na czynną indukcję EAE. Mogłoby to sugerować rolę tej molekuly w indukcji EAE, jednak stwierdzono, że również pozbawienie tak zmodyfikowanych myszy limfocytów CD8⁺ przywraca podatność na chorobę. Ponadto myszy pozbawione zarówno cząsteczki CD8, jak i CD28 (CD8^{-/-}CD28^{-/-}) również wykazywały wrażliwość na EAE. Poza tym wykazano, że u myszy pozbawionych cząsteczki CD8 (CD8^{-/-}) rozwijało się EAE o znacznie cięższym przebiegu, w porównaniu do zwierząt kontrolnych, tj. z ekspresją CD8, a adoptywny transfer limfocytów CD8⁺CD28⁻ do myszy CD8^{-/-} zmniejszał istotnie nasilenie choroby, podczas gdy podanie komórek CD8⁺CD28⁺ nie wpływało na jej przebieg. Godne uwagi jest to, że w niektórych eksperymentach badacze nie sortowali komórek o fenotypie CD8⁺CD28⁻, lecz po prostu używali limfocytów CD8⁺ pozyskanych od myszy pozbawionych ekspresji cząsteczki CD28 i komórki te wykazywały działanie supresorowe porównywalne do limfocytów CD8⁺CD28⁻, wysortowanych od myszy niezmienionych genetycznie (26). W badaniach tych wykazano, że limfocyty CD8⁺CD28⁻ hamowały produkcję IFN- γ przez limfocyty CD4⁺ specyficzne dla mielinowej glikoproteiny oligodendrocytów, co prawdopodobnie leżało u podstaw ich profilaktycznego i terapeutycznego działania.

Wyniki tych badań jasno wskazują, że brak cząsteczki CD28 nie jest przypadkowo zbieżny z występowaniem właściwości regulatorowych, lecz że faktycznie je determinuje, jakkolwiek również obecność cząsteczki CD8 jest z nimi powiązana. Należy przypomnieć, że cząsteczka CD28 występuje konstytutywnie na kilkudziesięciu % limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ (choć z wiekiem % komórek CD28⁺ znacznie spada, nawet do 10% w przypadku limfocytów CD4⁺), stanowiąc ich główną molekulę kostymulującą; poprzez oddziaływanie z receptorami CD80 i CD86 na APC bierze udział w aktywacji (drugi sygnał) limfocytów T (42).

W badaniach *in vitro* oceniano zarówno antygenowo specyficzne, jak i niespecyficzne limfocyty regulatorowe o fenotypie CD8⁺CD28⁻ i na takie dwie grupy podzielono te komórki. Trudno powiedzieć, czy podział ten i związane z nim konkluzje faktycznie odzwierciedlają stan, jaki ma miejsce *in vivo*. Antygenowo specyficzne limfocyty regulatorowe CD8⁺CD28⁻ różnią się od swoich niespecyficznych odpowiedników zarówno pod względem fenotypowym, jak i sposobu oraz siły działania. Fenotyp niespecyficznych antygenowo limfocytów CD8⁺CD28⁻ został gruntownie oceniony w badaniach Fenoglio i wsp. (8), w których stwierdzono m.in., że komórki te są pozbawione ekspresji czynnika transkrypcyjnego Foxp3 oraz cząsteczki CD56 (cząsteczka adhezyjna występująca m.in. na komórkach NK), a ponadto nie wykazują obecności lub ewentualnie niską ekspresję cząsteczki CD127, czyli łańcucha α receptora IL-7. Molekuła ta jest zaangażowana w generowanie i przeżywalność limfocytów pamięci, a komórki efektorowe posiadają jej wysoką ekspresję (17). Opierając się na wy-

nikach tych badań, można określić fenotyp omawianych komórek jako CD8⁺CD28⁻CD56⁻Foxp3⁻CD127^{low/-}. Wykazano ponadto, że limfocyty te nie wykazywały proliferacji po stymulacji z użyciem różnych antygenów, co sugeruje ich anergiczną naturę (8). Antygenowo niespecyficzne komórki CD8⁺CD28⁻ pozbawione są czynnika transkrypcyjnego Foxp3 oraz cząsteczki CD62L (33) i CTLA-4 (26), podczas gdy ich ekspresję wykazują antygenowo swoiste odpowiedniki tych limfocytów (33). Zaburzenia w generowaniu antygenowo niespecyficznych limfocytów CD8⁺CD28⁻ obserwowano w przebiegu różnych chorób autoimmunizacyjnych, obejmujących stwardnienie rozsiane, toczeń rumieniowaty i twardzinę układową (8, 10), co wspiera hipotezę, że patogenesa tych chorób może pozostawać w związku z redukcją lub utratą właściwości regulatorowych, przez wyżej wymienione komórki (8). Badania z ostatnich lat wskazują, że limfocyty te mogą wywierać działanie protekcyjne przed odrzuceniem przeszczepu wątroby (20, 21).

Mechanizm regulatorowego wpływu nieswoistych antygenowo limfocytów CD8⁺CD28⁻ był określany przez Filaci i wsp. (9). Stwierdzono, że komórki te wywierają działanie supresorowe na proliferację DC oraz antygenowo specyficznych limfocytów CD4⁺ a ponadto hamują antygenowo specyficzną odpowiedź cytotoksycznych limfocytów T poprzez redukcję ekspresji cząsteczek HLA klasy I na powierzchni komórek docelowych, a w działaniach tych pośredniczy IL-10.

Ludzkie antygenowo specyficzne limfocyty regulatorowe CD8⁺CD28⁻ mogą być generowane *in vitro* w wyniku powtarzanej stymulacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) allogenicznymi (23) lub ksenogenicznymi (3) APC bądź też własnymi APC ekspozowanymi na działanie konwencjonalnych antygenów (15). Limfocyty te rozpoznają antygen w kontekście białek MHC klasy I na stymulacyjnych APC i powodują ich przekształcenie w tolerogenne APC, poprzez indukowanie na powierzchni tych komórek hamujących receptorów ILT-3 i ILT-4 (immunoglobulin-like receptors) oraz poprzez redukcję ekspresji cząsteczek kostymulujących, takich jak CD80 i CD86 (22, 23). Tak zmodyfikowane APC nie przekazują limfocytom CD4⁺ wystarczająco silnego sygnału kostymulującego, w wyniku czego dochodzi do wywołania antygenowo specyficznej niereaktywności limfocytów CD4⁺ pomocniczych. Oprócz anergii tych komórek, tolerogenne APC mogą indukować powstawanie limfocytów regulatorowych CD4⁺CD25⁺ oraz CD8⁺CD28⁻ (2, 37). Dochodzi więc do rodzaju dodatniego sprzężenia zwrotnego z samonapędzającą się pętlą, w której tolerogenne APC generują powstanie limfocytów regulatorowych, a te z kolei indukują powstanie tolerogennych APC. Ostatnio opublikowane wyniki badań (30) świadczą, że antygenowo specyficzne limfocyty regulatorowe CD8⁺CD28⁻ cechuje znacznie silniejsze działanie supresorowe na komórki docelowe, w porównaniu do ich niespecyficznych odpowiedników. Wskazuje to więc, że rozpoznanie antygenu przez limfocyty CD8⁺CD28⁻ wzmacnia ich właściwości regulatorowe i pozwala mieć nadzieję, że w przy-

szłości komórki te będą mogły zostać wykorzystane w antygenowo specyficznej terapii immunosupresyjnej (30). Zważywszy na to, że naiwne limfocyty CD8⁺CD28⁻ nie posiadają czynnika transkrypcyjnego Foxp3 i dopiero stymulacja antygenowa wyzwała jego ekspresję (33), można stawiać hipotezę, że obecność Foxp3 w specyficznych antygenowo limfocytach CD8⁺CD28⁻ pozostaje w związku z ich wzmocnionym działaniem regulatorowym.

Piśmiennictwo

1. Bienvenu B., Martin B., Auffray C., Cordier C., Becourt C., Lucas B.: Peripheral CD8⁺CD25⁺ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J. Immunol.* 2005, 175, 246-253.
2. Chang C. C., Ciubotariu R., Manavalan J. S., Yuan J., Colovai A. I., Piazza F., Lederman S., Colonna M., Cortesini R., Dalla-Favera R., Suci-Foca N.: Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 2002, 3, 237-243.
3. Ciubotariu R., Colovai A. I., Pennesi G., Liu Z., Smith D., Berlocco P., Cortesini R., Suci-Foca N.: Specific suppression of human CD4⁺ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells. *J. Immunol.* 1998, 161, 5193-5202.
4. Correale J., Villa A.: Role of CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2010, 67, 625-638.
5. Cosmi L., Liotta F., Lazzeri E., Francalanci M., Angeli R., Mazzinghi B., Santarlasci V., Manetti R., Vanini V., Romagnani P., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F.: Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood* 2003, 102, 4107-4114.
6. Dai H., Wan N., Zhang S., Moore Y., Wan F., Dai Z.: Cutting edge: Programmed Death-1 defines CD8⁺ CD122⁺ T cells as regulatory versus memory T cells. *J. Immunol.* 2010, 185, 803-807.
7. Endharti A. T., Rifa'i M., Shi Z., Fukuoka Y., Nakahara Y., Kawamoto Y., Takeda K., Isobe K., Suzuki H.: Cutting edge: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN- γ production and proliferation of CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 2005, 175, 7093-7097.
8. Fenoglio D., Ferrera F., Fravega M., Balestra P., Battaglia F., Proietti M., Andrei C., Olive D., Antonio L. C., Indiveri F., Filaci G.: Advancements on phenotypic and functional characterization of non-antigen-specific CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 2008, 69, 745-750.
9. Filaci G., Fravega M., Negrini S., Procopio F., Fenoglio D., Rizzi M., Brenci S., Contini P., Olive D., Ghio M., Setti M., Accolla R. S., Puppo F., Indiveri F.: Nonantigen specific CD8⁺ T suppressor lymphocytes originate from CD8⁺CD28⁻ T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum. Immunol.* 2004, 65, 142-156.
10. Filaci G., Rizzi M., Setti M., Fenoglio D., Fravega M., Basso M., Ansaldo G., Ceppa P., Borgonovo G., Murdaca G., Ferrera F., Picciotto A., Fiocca R., Torre G., Indiveri F.: Non antigen-specific CD8(+) T suppressor lymphocytes in diseases characterized by chronic immune responses and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1050, 115-123.
11. Filaci G., Suci-Foca N.: CD8⁺ T suppressor cells are back to the game: are they players in autoimmunity? *Autoimmun. Rev.* 2002, 1, 279-283.
12. Freedman M. S., Ruijs T. C., Blain M., Antel J. P.: Phenotypic and functional characteristics of activated CD8⁺ cells: a CD11b-CD28⁻ subset mediates non-cytolytic functional suppression. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1991, 60, 254-267.
13. Hahn B. H., Singh R. P., La Cava A., Ebling F. M.: Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGF β secreting CD8⁺ T cell suppressors. *J. Immunol.* 2005, 175, 7728-7737.
14. Hancock W. W., Lu B., Gao W., Cszimadia V., Faia K., King J. A., Smiley S. T., Ling M., Gerard N. P., Gerard C.: Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J. Exp. Med.* 2000, 192, 1515-1520.
15. Jiang S., Tugulea S., Pennesi G., Liu Z., Mulder A., Lederman S., Harris P., Cortesini R., Suci-Foca N.: Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum. Immunol.* 1998, 59, 690-699.
16. Jiang L., Yang P., He H., Li B., Lin X., Hou S., Zhou H., Huang X., Aize K.: Increased expression of Foxp3 in splenic CD8⁺ T cells from mice with anterior chamber-associated immune deviation. *Mol. Vis.* 2007, 13, 968-974.
17. Kaeck M., Tan J. T., Wherry E. J., Konieczny B. T., Surh C. D., Ahmed R.: Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* 2003, 4, 1191-1198.
18. Kapp J. A., Honjo K., Kapp L. M., Xu X., Cozier A., Bucy R. P.: TCR transgenic CD8⁺ T cells activated in the presence of TGF β express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. *Int. Immunol.* 2006, 18, 1549-1562.
19. Lee Y. H., Ishida Y., Rifa'i M., Shi Z., Isobe K., Suzuki H.: Essential role of CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2008, 180, 825-832.
20. Lin Y. X., Yan L. N., Li B., Wang L. L., Wen T. F., Zeng Y., Wang W. T., Zhao J. C., Yang J. Y., Xu M. Q., Ma Y. K., Chen Z. Y., Bai Y. J.: A significant expansion of CD8⁺ CD28⁻ T-suppressor cells in adult-to-adult living donor liver transplant recipients. *Transplant. Proc.* 2009, 41, 4229-4231.
21. Liu Y., Chen N., Chen G., You P.: The protective effect of CD8⁺CD28⁻ T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation. *Transplant. Proc.* 2007, 39, 3396-3403.
22. Liu Z., Tugulea S., Cortesini R., Lederman S., Suci-Foca N.: Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by T suppressor cells. *Hum. Immunol.* 1999, 60, 568-574.
23. Liu Z., Tugulea S., Cortesini R., Suci-Foca N.: Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8⁺CD28⁻ T cells. *Int. Immunol.* 1998, 10, 775-783.
24. Maggi E., Cosmi L., Liotta F., Romagnani P., Romagnani S., Annunziato F.: Thymic regulatory T cells. *Autoimmun. Rev.* 2005, 4, 579-586.
25. Mahic M., Henjum K., Yagub S., Bjornbeth B. A., Torgersen K. M., Taskén K., Aandahl E. M.: Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur. J. Immunol.* 2008, 38, 640-646.
26. Najafian N., Chitnis T., Salama A. D., Zhu B., Benou C., Yuan X., Clarkson M. R., Sayegh M. H., Khoury S. J.: Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1037-1048.
27. Niederkorn J. Y.: Anterior chamber-associated immune deviation and its impact on corneal allograft survival. *Curr. Opin. Organ. Transplant.* 2006, 11, 360-365.
28. Pomić C., Ménager-Marcq I., van Meerwijk J. P.: Murine CD8⁺ regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum. Immunol.* 2008, 69, 708-714.
29. Poussier P., Ning T., Banerjee D., Julius M. A.: Unique subset of self-specific intra-intestinal T cells maintains gut integrity. *J. Exp. Med.* 2002, 195, 1491-1497.
30. Renner P., Popp F. C., Eggenhofer E., Slowik P., Piso P., Geissler E. K., Schlitt H. J., Dahlke M. H.: Antigen-specific recognition is critical for the function of regulatory CD8(+)CD28(-) T cells. *Transpl. Immunol.* 2010, 22, 144-149.
31. 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, 1123-1134.
32. Rifa'i M., Shi Z., Zhang S. Y., Lee Y. H., Shiku H., Isobe K., Suzuki H.: CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I- α betaTCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *Int. Immunol.* 2008, 20, 937-947.
33. Scotto L., Naiyer A. J., Galluzzo S., Rossi P., Manavalan J. S., Kim-Schulze S., Fang J., Favera R. D., Cortesini R., Suci-Foca N.: 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.* 2004, 65, 1297-1306.
34. Seo S. K., Choi J. H., Kim Y. H., Kang W. J., Park H. Y., Suh J. H., Choi B. K., Vinay D. S., Kwon B. S.: 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 2004, 10, 1088-1094.
35. Shi Z., Okuno Y., Rifa'i M., Endharti A. T., Akane K., Isobe K., Suzuki H.: Human CD8⁺CXCR3⁺ T cells have the same function as murine CD8⁺CD122⁺ Treg. *Eur. J. Immunol.* 2009, 39, 2106-2119.
36. Shi Z., Rifa'i M., Lee Y. H., Shiku H., Isobe K., Suzuki H.: Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Immunology* 2008, 124, 121-128.
37. Suci-Foca N., Manavalan J. S., Scotto L., Kim-Schulze S., Galluzzo S., Naiyer A. J., Fan J., Vlad G., Cortesini R.: Molecular characterization of allo-specific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int. Immunopharmacol.* 2005, 5, 7-11.
38. Sugita S., Futagami Y., Horie S., Mochizuki M.: TGF β -producing Foxp3⁺ CD8⁺CD25⁺ T cells induced by iris pigment epithelial cells display regulatory phenotype and acquire regulatory functions. *Exp. Eye Res.* 2007, 85, 626-636.
39. Suzuki H., Kundig T. M., Furlonger C., Wakeham A., Timms E., Matsuyama T., Scimits R., Simard J. J. L., Ohashi P. S., Griesser H., Taniguchi T., Paige C. J., Mak T. W.: Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor β . *Science* 1995, 268, 1472-1476.
40. Suzuki H., Shi Z., Okuno Y., Isobe K.: Are CD8⁺CD122⁺ cells regulatory T cells or memory T cells? *Hum. Immunol.* 2008, 69, 751-754.
41. Tang X., Maricic I., Purohit N., Bakamjian B., Reed-Loisel L. M., Beeston T., Jensen P., Kumar V.: Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8 α CD8 β TCR α CD8 β T cells. *J. Immunol.* 2006, 177, 7645-7655.
42. Weng N. P., Akbar A. N., Goronzy J.: CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 2009, 30, 306-312.
43. Zimring J. C., Levery S. B., Kniep B., Kapp L. M., Fuller M., Kapp J. A.: CD75 is a marker of murine CD8(+) suppressor T cells. *Int. Immunol.* 2003, 15, 1389-1399.

Adres autora: dr Tomasz Maślanka, ul. Żołnierska 14C/310, 10-561 Olsztyn; e-mail: tomasz.maslanka@uwm.edu.pl