

Regulačné T- a B-lymfocyty za fyziologických a patologických podmienok

Regulatory T and B lymphocytes under physiological and pathological conditions

MILAN BUC

Imunologický ústav, Lekárska fakulta UK, Bratislava

SÚHRN

Základnou vlastnosťou imunitného systému je jeho schopnosť rozlíšiť vlastné molekuly buniek, tkanív a orgánov od nevlastných, vlastné tolerovať a cudzie likvidovať. V minulosti sme sa zameriavali najmä na rôzne mechanizmy, akými imunitný systém rozpozná a zničí vonkajšieho narušiteľa integrity organizmu. Neskôr sme sa zamerali na spôsoby, akým imunitný systém toleruje vlastné antigény, resp. ako reguluje rozsah prebiehajúcich reakcií, aby nevyústili do autoimunitných či alergických procesov. Ďalej, ukázalo sa, že imunitný systém je síce vynikajúcim bojovníkom proti nádorovým bunkám, ale na druhej strane je aj príčinou, prečo tieto svojej záhube unikajú. V oboch uvedených procesoch zohrávajú dôležitú úlohu imunosupresívne mechanizmy, medzi ktorými jedni z najvýznamnejších patria tie, ktoré zabezpečujú regulačné T- a B-lymfocyty. Cieľom predkladanej práce je podať aktuálnu informáciu o uvedených bunkách, ktoré zabezpečujú jemnú rovnováhu medzi prozápalovou odpoveďou, ktorá je potrebná na zdlanie infekcie a imunosupresívnu odpoveďou, aby sa zabránilo chronickému zápalu a poškodeniu tkaniva. Navyše sa v článku poukazuje na možnosť využitia týchto buniek v liečbe niektorých autoimunitných chorôb.

Kľúčové slová: AIRE, cytokíny, IgG4, imunokorekcia, NKT-bunky, SLE, regulačné B- a T-lymfocyty

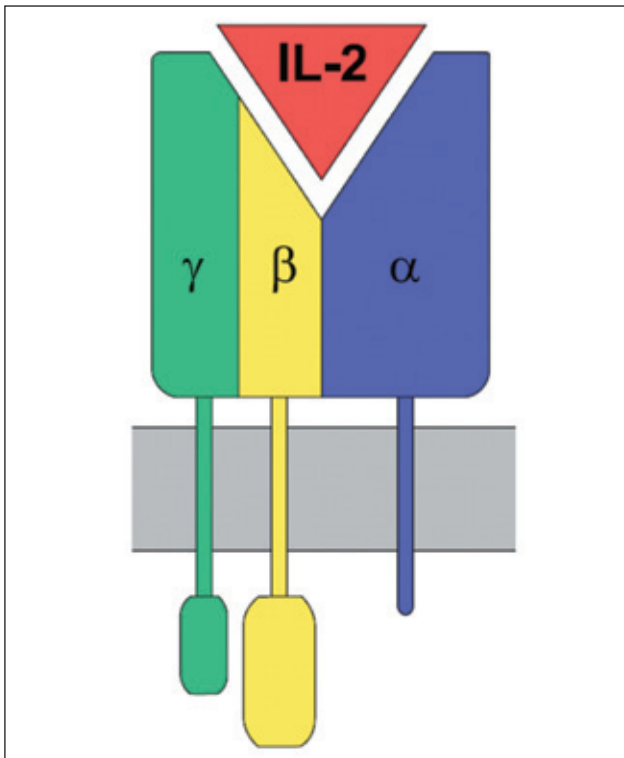
SUMMARY

Basic characteristic of the immune system is its ability to distinguish self-molecules of cells, tissues and organs from not self, to tolerate self and dispose of not self. In the past, we concentrated on various defence mechanisms by which the immune system recognises and destroys intruders of our integrity. Later, we paid attention how the immune system tolerate our own antigens or regulate extent of ongoing reactions to prevent induction of autoimmune or allergic processes. Further, it was shown that the immune system plays a decisive role in fighting malignant cells; however, on the other site, it was responsible for their evasion from their destruction too. Immunosuppressive mechanisms, especially those mediated by regulatory B and T cells, play a paramount role in the aforementioned processes. The aim of this article is to offer a reader a topical information on these cells, which secure fine equilibrium between a proinflammatory response responsible for elimination of an infection and an immunosuppressive response, which prevents chronic inflammation and tissue damage. Moreover, the author indicates possibilities to use them in the therapy of some autoimmune diseases.

Key words: AIRE, cytokines, IgG4, immunocorrection, NKT cells, SLE, regulatory B and T lymphocytes

Indukcia a udržiavanie imunitnej tolerancie na vlastné a neškodné environmentálne antigény je základným princípom predchádzania vzniku autoimunitných procesov a chronického zápalu. Imunosupresívne mechanizmy sú tiež veľmi dôležité, aby udržali rozsah zápalu na primeranej úrovni. U zdravých osôb sa preto vytvára jemná rovnováha medzi prozápalovou odpoveďou, ktorá je potrebná na zdlanie infekcie a imunosupresívnu odpoveďou, aby sa zabránilo chronickému zápalu a poškodeniu tkaniva. Imunitný systém vyvinul viacero mechanizmov, aby nereagoval na vlastné antigény, či už fyzickou elimináciou autoreaktívnych lymfocytov v týmuse alebo zábranou ich aktivácie na periférii. Práve túto poslednú funkciu imunitného systému zabezpečujú predovšetkým regulačné T- a B-lymfocyty.

Prirodzené regulačné T-lymfocyty (nTreg) potláčajú aktivitu T-lymfocytov (tak $\alpha\beta$ ako aj $\gamma\delta$), B-lymfocytov, NK-, NKT-buniek, dendritových buniek a makrofágov. nTreg-lymfocyty sa vyvíjajú v dreni týmusu ako nezávislá, samostatná populácia buniek. Diferenciácia nTreg-lymfocytov si vyžaduje aktiváciu špecifického génu - *FOXP3* (*forkhead box P3*; Xp11.23-q13.3), ktorý kóduje rovnomenný transkripčný faktor a ovplyvňuje aktiváciu alebo represiu viac ako 1 400 génov (1–3). Tento sa však objavuje až v druhej ich fáze diferenciácie. Prvý diferenciačný signál zabezpečuje signalizácia cez antigénový receptor $\alpha\beta$ T-lymfocytov (TCR), ktorý vedie k expresii CD25 (alfa-reťazec vysokoafinitného receptora pre IL-2) ako aj charakteristických membránových molekúl nTreg-buniek GITR, OX40 a TNFR2;



Obr. 1: Receptor pre IL-2

Receptor pre IL-2 sa skladá z troch reťazcov – α (CD25), β (CD122) a γ (CD132). α -reťazec sa v membráne bunky objavuje iba po jej aktivácii. γ -reťazec je súčasťou receptorov aj pre ďalšie cytokíny, a preto sa označuje ako γc (c = common, t. j. spoločný)

k tvorbe transkripčného faktora FOXP3 však ešte nedochádza. Ten sa objavuje až v druhej fáze, pod vplyvom IL-2 (4, 5). O veľkom biologickom význame FOXP3 svedčí skutočnosť, že ak dôjde k jeho mutácii (dodnes sa ich opísalo viac než 75), vznikne choroba, ktorá je nezlučiteľná so životom – IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy*) (6, 7). Prejavuje sa pretrvávajúcimi hnačkami v dôsledku zápalu čreva a atrofie klkov (GIT a kožu masívne infiltrujú lymfocyty), autoimunitným diabetom, tyreoiditídou, hepatitídou a anémiou. Postihnuté deti trpia aj alergickými prejavmi, ako je atopická dermatitída, astma a alergia na potraviny. Pri vyšetrení sér od takýchto pacientov sa dokážu vysoké titry rôznych autoprotílátok, vysoké hladiny IgE a eozinofília (8). Pokiaľ sa postihnuté deti nepodrobia transplantácii hematopoetických buniek, zomierajú do 3 mesiacov (3). Podobne pre diferenciáciu nTreg-lymfocytov v týmuse je nevyhnutný aj gén determinujúci imunosupresívnu molekulu CTLA-4 (9).

Treg-lymfocyty predstavujú 5-10 % $CD4^+CD8^-$ tymocytov, v periférii je ich približne 10 % z celej populácie $CD4^+$ -lymfocytov (10, 11). Sú to dlho žijúce bunky, ktoré charakterizujú viaceré membránové molekuly. Problémom však je, že nie sú špecifické iba pre nTreg-lymfocyty; typicky majú CD4 a CD25. CD25 (obr. 1) však vlastní aj aktivované T-lymfocyty. Neskôr sa ukázalo, že nTreg-lymfocyty majú zníženú expresiu CD127 (α -reťazec receptora pre IL-7) (12), ale opäť to nemožno považovať typické len pre nTreg, lebo aj

aktivované $CD4^+$ -lymfocyty majú tendenciu znižovať množstvo tohto antigénu vo svojich membránach.

nTreg-lymfocyty sú prirodzene anergické (t. j. pri *in vitro* stimulácii monoklonovými anti-CD3 protílátkami, fytohemaglutinínom alebo alogénnymi bunkami neproliferujú a neprodukujú ani IL-2). Výrazne však tlmia indukciu imunitnej odpovede. Mechanizmy, akým to robia, sú viaceré; v podstate ich možno rozdeliť do piatich skupín: 1. prostredníctvom inhibičných cytokínov (IL-10, IL-35 a TGF- β), 2. indukciou apoptózy, 3. prostredníctvom indukcie zmien v metabolizme (produkujú indolamín 2, 3-deoxygenázu, ktorá katabolizuje tryptofán, čo je esenciálna aminokyselina potrebná na proliferáciu T-lymfocytov a svojimi membránovými exonukleázami CD37 a CD39 zabezpečujú v prostredí imunosupresívny adenzín), 4. moduláciou dozrievania alebo funkcie DC a napokon mechanizmom trogocytózy, t. j. odstránením komplexu „HLA-molekula - peptid“ z membrány dendritovej bunky (DC), ktorá takto stratí schopnosť indukovať efektorové bunky (13–15).

Výsledky výskumu ostatných rokov ukazujú, že z týmusa sa na perifériu kontinuálne dostávajú autoreaktívne T-lymfocyty vo väčšej miere, ako sme si to doteraz mysleli, a prakticky permanentne dochádza k ich aktivácii. Ich diferenciáciu do plne funkčných efektorových buniek blokujú práve nTreg-lymfocyty. Migračné dendritové bunky konštantne prinášajú z tkanív a orgánov do lymfatických uzlín autoantigény, ktoré následne rozpoznávajú autoreaktívne T-lymfocyty, ktoré po svojej aktivácii by mohli spustiť autoimunitné procesy. Zabránia im v tom nTreg-lymfocyty, ktoré tiež rozpoznávajú prezentované autoantigény. Navyše ich imunosupresívnu aktivitu zvyšuje IL-2, ktorý produkujú aktivované efektorové T-lymfocyty. Tým dochádza k ich expanzii a vytvoreniu mikroprostredia, ktoré znemožní indukciu autoimunitných procesov. Táto interakcia medzi migračnými DC a efektorovými a regulačnými lymfocytmi na deje na periférii paraktortikálnej oblasti lymfatických uzlín, v zhlukoch oddelených od seba (16, 17). Tento poznatok opäť iba potvrdil naše predchádzajúce vedomosti, že IL-2 nie je hlavným cytokínom potrebným na rozvoj efektorovej imunitnej odpovede, ako sme si pôvodne mysleli, ale že ide o cytokín, ktorý zabezpečuje existenciu a aktivitu nTreg-lymfocytov.

Jeden z najnovších poznatkov v oblasti regulačných T-lymfocytov bolo zistenie ich prítomnosti v tkanivách za fyziologických aj za stresových podmienok. Tieto tkanivovo rezidentné Treg-lymfocyty môžu takto zabezpečovať neimunologické funkcie a prispievať k homeostáze tkanív a hojenia rán. Ukazuje sa tak, že imunitný systém bude zohrávať nielen dôležitú úlohu v obranyschopnosti, ale aj v homeostáze organizmu. Rozbehli sa štúdie, ktoré definujú špecifický fenotyp Treg-lymfocytov v svaloch, koži, pľúcach, GIT, pečeni, tukovom tkanive a iných miestach organizmu (18, 19).

Regulačné T-lymfocyty môžu vznikáť aj na periférii. Ide o **indukované regulačné T-lymfocyty (iTreg)**, ktoré sa diferencujú z naivných $CD4^+$ T-lymfocytov počas imunitnej odpovede (20). Vznikajú najmä v slizničných priestoroch; najlepšie tieto udalosti poznáme v čreve. Ak na

naivné CD4⁺ T-lymfocyty pôsobí TGF- β , IL-2 a kyselina retinová, ktorú spracovaním vitamínu A produkujú dendritové bunky, diferencujú sa na iTreg-lymfocyty. Najnovšie sa zistilo, že tieto môžu vzniknúť pod vplyvom IL-33, ktorý sa konštitutívne exprimuje v epitelových bunkách čreva a po ich poškodení sa uvoľňuje do prostredia a pôsobí ako alarmín (21). Po väzbe na svoj receptor, ST2, spolu so signalizáciou, ktorú spúšťa TGF- β , podporuje aktiváciu transkripčného faktora GATA3, čo je známy transkripčný regulátor *FOXP3*-génu. Navyše IL-33 zvyšuje aj syntézu svojho receptora, zvyšujúc tak pretrvávanie iTreg-lymfocytov v danom mikroprostredí (22).

V porovnaní s nTreg-lymfocytmi sú iTreg-bunky menej stabilné a v zápalovom prostredí môžu stratiť schopnosť exprimovať FOXP3 a naopak syntetizovať, produkovať prozápalové cytokíny, ako je IFN- γ a IL-17. Tento nedostatok stability možno vysvetliť metylačným stavom CNS2-oblasti (conserved non-coding region 2) v promótorovej oblasti *FOXP3*-génu¹. Táto oblasť je pri nTreg-bunkách stabilne hypometylovaná aj v zápalovom prostredí, kým pri iTreg-bunkách je len nekomplementne demetylovaná (23, 24).

iTreg sú tiež FOXP pozitívne a bol problém, ako ich odlíšiť od nTreg. Vyriešilo sa to nedávno, keď sa zistila rozdielna expresia membránových molekúl, konkrétne **neuropilínu 1** (NRP1). Kým nTreg-lymfocyty ho majú v svojich membránach hodne, tak iTreg-lymfocyty naopak len veľmi málo, alebo vôbec nie (25, 26). Podobne je to aj s transkripčným faktorom **Helios** (27). Keďže tento sa nachádza intracelulárne, je výhodnejšie určovať membránovú molekulu **TIGIT**, ktorej expresia koreluje s expresiou Helios (24). iTreg-lymfocyty svoju imunosupresívnu aktivitu presadzujú, podobne ako nTreg, kontaktným alebo bezkontaktným (syntézou najmä TGF- β) spôsobom (26).

nTreg- a iTreg-lymfocyty sú rozdielne populácie buniek. Zistilo sa, že v sekundárnych lymfoidných orgánoch sa nachádzajú v rozdielnych oddeleniach a že deficiencia iTreg-lymfocytov nevedie k ich nahradeniu nTreg-lymfocytmi. Navyše, kým deficiencia nTreg-lymfocytov spôsobí systémovú autoimunitnú chorobu (IPEX), tak deficiencia iTreg nevyvolá nijakú systémovú chorobu, ale indukuje zápal slizničných systémov, v čreve kolitídu a v respiračnom trakte *asthma bronchiale* (28, 29).

Okrem uvedených subpopulácií so supresívnymi funkciami existuje aj ďalšia populácia imunosupresívne pôsobiacej buniek, označovaných ako **Tr1-lymfocyty**. Vznikajú pod vplyvom súčasného pôsobenia IL-27 a TGF- β na naivné Th-lymfocyty a produkuje predovšetkým IL-10. Okrem toho imunitnú odpoveď tlmia aj tak, že zabíjajú bunky prezentujúce antigén perforínovo-granzýmovým mechanizmom. Okrem CD4, charakterizujú ich špecifické znaky CD49b a LAG-3 (CD223); CD49b je v ich membránach prítomný bez ohľadu na aktivačný stav, LAG-3 sa však v nich objavuje až po aktivácii, keď začnú syntetizovať IL-10. Tr1-lymfocyty sú FOXP3

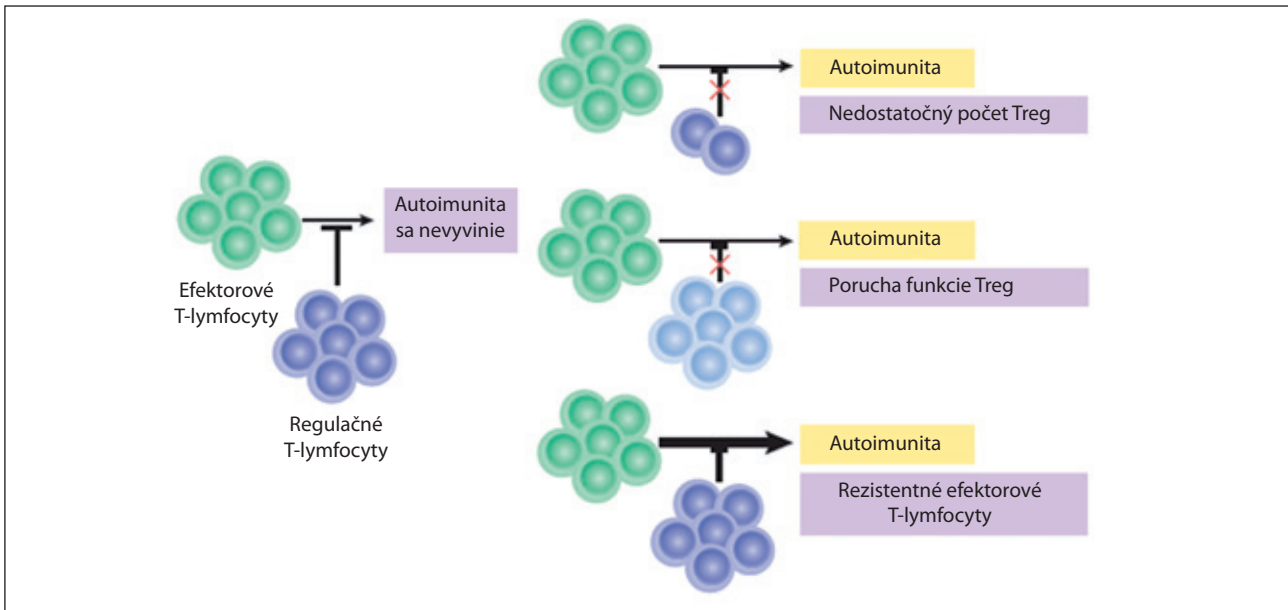
negatívne, namiesto toho exprimujú viaceré transkripčné faktory typické pre iné subpopulácie T-lymfocytov, napr. c-MAF, AHR a iné (30, 31).

Hlavnou biologickou funkciou Treg-lymfocytov, ako vyplýva z predchádzajúceho textu, je udržanie imunitných a zápalových procesov vo fyziologických hraniciach. Ich chýbanie, alebo porucha funkcie sa zákonite prejaví vývojom autoimunitných chorôb. Porucha funkcie sa dokázala pri vývoji *diabetes mellitus* prvého typu (32), reumatoidnej artritídy (33), *myastenia gravis* (34), *sclerosis multiplex* (35, 36) a pri iných chorobách. Zníženie ich počtov sa potvrdilo pri m. Crohn a ulceróznej kolitíde (37) a vaskulitíde vyvolanej vírusom hepatitídy C (38). Pri systémovom *lupus erythematosus* (SLE) perzistentné prozápalové cytokínové prostredie zabraňuje Treg-lymfocytom presadiť svoje imunosupresívne pôsobenie (39, 40) (obr. 2). Treba však podotknúť, že výsledky jednotlivých autorov sa od seba do značnej miery odlišujú, v závislosti od toho, ktoré markery sa na identifikáciu nTreg-lymfocytov použili (24).

Znížené počty nTreg-lymfocytov sa pozorujú aj u alergických pacientov, čo spôsobuje zníženú kontrolu aktivity Th2-lymfocytov (3). Tu sa potvrdzuje aj hygienická hypotéza – nedostatočná aktivácia Th1-lymfocytov spôsobuje aj malú produkciu IL-2 a tým aj pôsobenie nTreg-lymfocytov.

Imunitný dohľad (immune surveillance) má úlohu aj v prevencii rozvoja nádorov. Vzťah medzi nádorom a imunitným systémom je však dynamický, plastický, a preto sa v súčasnosti upúšťa od pojmu „imunitný dohľad“ a nahrádza sa pojmom „**imunokorekcia**“ (cancer immunoediting). Jeho podstatou je, že imunitný systém okrem toho, že chráni hostiteľa pred vytvorením nádoru, „tvaruje“ aj imunogénnosť nádorových buniek. Počas tohto „tvarovania“ dochádza ku zmene silných imunogénnych nádorovo-špecifických antigénov na slabé. Má tri štádiá, ktoré dostali pomenovanie podľa začiatkových písmen anglických slov ako tri „E“: 1. „elimination“ (eliminácia), 2. „equilibrium“ (rovnováha) a 3. „escape“ (únik) (41, 42). Počas prvého štádia imunitný systém rozpozná a rýchlo likviduje nádorové bunky. Druhé štádium je štádiom rovnováhy a „spania“ (dormancy) nádoru – v tomto štádiu možno nájsť tzv. okultný alebo klinicky tichý nádor (42, 43). Fáza rovnováhy býva najdlhšia a môže trvať aj niekoľko rokov. Tretie štádium je štádiom úniku. Po odstránení susceptibilných nádorových buniek sa tieto postupne nahradia imunorezistentnými genetickými variantmi, ktoré rýchlo proliferujú a podliehajú ďalším genetickým modifikáciám. Tieto sa dokážu vyhnúť deštrukčným mechanizmom imunitného systému a navyše tmením pôsobenia buniek imunitného systému ešte aj potláčajú protinádorovú odpoveď. K bunkám, ktoré potláčajú protinádorovú imunitu, patria M2-makrofágy, MDSC-bunky (myeloid-derived suppressor cells) a aj Treg-lymfocyty (44, 45). Nádorové Treg-bunky sú uniformne veľmi aktivované, čo sa prejavuje najmä expresiou inhibičných molekúl, ako sú

1. Metylácia génov spôsobuje ich zníženú transkripciu.



Obr. 2: Príčiny neúspešnej funkcie regulačných T-lymfocytov (Treg) pri vývoji autoimunity

Regulačné T-lymfocyty neuplatnia svoju tlmivú funkciu pretože ich je málo v dôsledku určitej poruchy pri ich diferenciácii, ako je nedostatok cytokínov (IL-2, TGF- β), kostimulácie (CD28) a pod. Ďalej Treg-lymfocyty môžu byť v norme, ale nie sú plne funkčné, napr. neprodukujú dostatok imunosupresívnych cytokínov (IL-10, IL-35, TGF- β), alebo dochádza k poruche kontaktnej imunopresívnej interakcie. Napokon, aj počty aj funkcia Treg-lymfocytov je v norme, ale terčová skupina buniek na ich imunopresívne pôsobenie neodpovedá, napr. pre veľké množstvo cytokínov, ktoré produkujú (IL-2, IL-4, IL-6, IL-15) alebo svoj výslovne prozápalový charakter (Th17-subpopulácia).

CTLA-4, PD-1, LAG3 a TIGIT, ktorými blokujú cytotoxickú aktivitu efektorových buniek imunitného systému; navyše produkujú imunopresívne cytokíny (24, 47).

IL-2 má rozhodujúci vplyv na vznik a udržiavanie aktivity nTreg-lymfocytov. Táto skutočnosť priviedla na myšlienku využiť IL-2 v liečbe tých chorôb, kde je ich aktivita znížená. IL-2 je však aj silným aktivátorom aj NK-buniek, aj cytotoxických T-lymfocytov, a preto sa v liečbe musel aplikovať v dávke nedostatočnej na ich aktiváciu, ale postačujúcej na podporenie funkcie, resp. aj expanzie nTreg-buniek, inými slovami začala sa nízkodávková liečba IL-2. Táto liečba sa osvedčila pri liečbe autoimunitného *diabetes mellitus* (T1D), SLE, ateroskleróze a *alopecia areata* (24, 47). V súčasnosti sa odporúča začať 5-dňovú liečbu IL-2 v dávke jeden milión i. u./deň a opakovať ju v dvojtýždňových intervaloch. Úvodná liečba zvyšuje počty nTreg-lymfocytov v periférnej krvi na dvojnásobok a udržiavacie dávky spôsobia, že počty nTreg-lymfocytov sa pohybujú medzi 20–60 % nad základné hodnoty. Počet nTreg-lymfocytov sa zvyšuje a to nielen v periférnej krvi, ale aj v mieste prebiehajúcich autoimunitných procesov (dokázané v bi-optických vzorkách pri *alopecia areata*) (47).

Vylepšenou metódou uvedenej terapie je podávanie IL-2 súčasne s monoklonovými protilátkami (mAb) proti nemu. Vytvorili sa humánne mAb proti IL-2. Tieto stabilizujú súčasne podaný humánny IL-2 v takej konformácii, ktorý podporí expanziu nTreg-lymfocytov. Komplex „mAb – IL-2“ indukoval remisiu T1D v myšom NOD modeli, redukoval intenzitu patologických procesov pri experimentálnej alergickej encefalitíde a chránil myši pri xenogénnej chorobe štepu proti hostiteľovi (GvH) (48), čo je prísľubom aj pre humánnu medicínu.

Ďalšou možnosťou liečby je podávanie nTreg-lymfocytov samotných. Tieto sa vyzisolujú z periférnej krvi pacienta a v *in vitro* podmienkach (aktivácia za prítomnosti IL-2 a monoklonových protilátok anti-TCR a anti-CD80) sa rozmnožia. Obyčajne dôjde k 500 až 2 000-násobnému zvýšeniu ich počtov; následne sa aplikujú pacientovi. Dokázalo sa, že takto rozmnožené nTreg-bunky pretrvávajú v organizme pacienta minimálne jeden rok. Prvá fáza úspešných klinických skúšok sa uskutočnila pri liečbe T1D (49) a zvládnutí choroby z GvH (GVHD) (50).

Regulačné T-lymfocyty poznáme už viac ako dve desaťročia (7). Nedávno k nim pribudli aj **regulačné B-lymfocyty** (Breg). V čom sa odlišujú od Treg-lymfocytov? Predovšetkým je to ich pôvod. Kým Treg-lymfocyty poznáme prirodzené a indukované, tak pri Breg-lymfocytoch sa zatiaľ nepodarilo zistiť ich špecifický transkripčný faktor, takže vznikajú len ako indukované. Vznikajú v zápalovom prostredí pod vplyvom prozápalových cytokínov, rozpoznávaním molekulových vzorov (PAMP) alebo priamo autoantigénov. V podstate každý B-lymfocyt, keď získa patričné signály, sa môže diferencovať na Breg-bunku. Svoju imunopresívnu aktivitu Breg-lymfocyty uplatňujú kontaktným (exprimujú FASL, PD1L, CTLA4) aj bezkontaktným spôsobom (prostredníctvom syntézy IL-10, IL-35 a TGF- β). Túto svoju schopnosť zvyšujú aj indukciou Treg-lymfocytov priamou kooperáciou s Th0-lymfocytmi za účasti HLA-II a kostimulačných (CD80) molekúl (51–53).

Breg-lymfocyty sú heterogénnou populáciou buniek. Najlepšie preskúmaná subpopulácia sa vyznačuje malou expresiou IgD vo forme antigénového receptora a molekulami CD1d, CD19, CD20, CD24 a CD38. Prekvapením

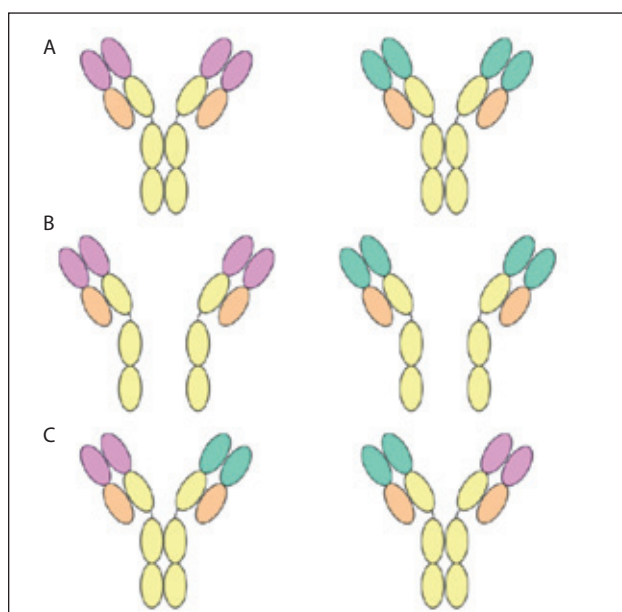
Tab. 1: Cytokinový profil jednotlivých subpopulácií pomocných T-lymfocytov

Cytokín	Th1	Th2	Th9	Th17	Th22	Tfh	Treg
IFN- γ	++	-	-	+	-	-	-
IL-2	++	-	-	-	-	-	-
IL-4	-	++	-	-	-	-	-
IL-5	-	++	-	-	-	-	-
IL-6	-	-	-	+	-	-	-
IL-13	-	++	-	-	+	-	-
IL-9	-	-	++	-	-	-	-
IL-10	+	++	++	+	-	-	++
IL-17	-	-	-	++	-	-	-
IL-21	-	-	-	-	-	++	-
IL-22	+	-	-	+	++	-	-
IL-26	-	-	-	+	-	-	-
TNF	++	+	-	+	+	-	-
Lymfotoxín	++	-	-	-	-	-	-

IFN- γ – interferón gama, IL – interleukín, TNF – faktor nekrotizujúci nádory, Tfh – folikulové pomocné T-lymfocyty

je, že regulačnú funkciu majú aj plazmatické bunky (51, 54). Breg-lymfocyty prezentáciou glykolipidov prostredníctvom svojich CD1d molekúl indukujú aj imunosupresívnu aktivitu NKT-buniek (syntézou IL-10). U pacientov so SLE sú počty NKT-buniek značne znížené práve pre poruchu funkcie Breg-lymfocytov (55). Pri SLE sa pozoroval aj ďalší defekt spojený s Breg-lymfocytmi. SLE charakterizuje o. i. aj zvýšená produkcia IFN- α plazmacytoïdnými bunkami (pDC) a zistilo sa, že sú to práve Breg-lymfocyty, ktorých nedostatočná funkcia nedokáže tlmiť ich nadmernú syntézu interferónov (56, 57). Naznačuje to, že u zdravých osôb existuje spätná väzba medzi Breg-lymfocytmi a pDC, kým u pacientov s SLE nie. Liečba pacientov rituximabom (monoklonové protilátky anti-CD20) viedla k znovuoobjaveniu sa Breg-lymfocytov, obnoveniu funkcie NKT-buniek a k zlepšeniu klinického stavu (56, 57).

Breg-lymfocyty majú význam aj v alergických reakciách. Tlmenie alergických procesov dosahujú najmä dvoma spôsobmi - inhibíciou dozrievania dendritových buniek a podporou syntézy IgG4-protílátok. Pri prvom spôsobe Breg-lymfocyty svojou syntézou IL-10 blokujú dozrievanie DC na zrelé bunky, čím im zabránia indukciu vzniku Th2-lymfocytov (58). Druhý spôsob sa zakladá na skutočnosti, že Breg-lymfocyty indukujú vznik modifikovaných Tfh-lymfocytov, ktoré syntézou IL-4 a IL-10 (namiesto IL-13) v zárodočných centrách podmienia syntézu IgG4-protílátok (58–60) (tab. 1) Tieto v rámci podtried IgG majú zvláštnu štruktúru a vlastnosti. Až pri 50 % IgG4-protílátok sa medzi ich ťažkými reťazcami nenachádzajú disulfidové väzby, čo umožní ich ťažkým reťazcom sa od seba oddeliť a spojiť s iným H-reťazcom inej IgG4-protílátky; dochádza teda k zmene Fab fragmentov a takáto hybridná protilátka je síce bišpecifická, ale funkčne monošpecifická (59, 61) (obr. 3). IgG4 protilátky majú takto zvýšenú schopnosť viazať alergény, pôsobia teda ako blokujúce protilátky. Navyše IgG4



Obr. 3: Výmena Fab-fragmentov pri protilátkach triedy IgG4 (modifikované podľa Davies AM a Sutton BJ, Immunol Rev 2015; 268:139-59)

A, Rozdielne protilátky triedy IgG4 s rozdielnymi špecifickosťami
B, Medzi ťažkými reťazcami sa nenachádzajú disulfidové väzby, čo im umožní sa od seba oddeliť

C, Ťažký reťazec jednej protílátky sa spája s ťažkým reťazcom inej IgG4 protílátky. Dochádza teda k zmene Fab fragmentov a takáto hybridná protilátka je síce bišpecifická, ale funkčne monošpecifická

protilátky sa viažu na receptor Fc γ RIIB, čo je inhibičný receptor, ktorý sa nachádza nielen na B-lymfocytoch, ale aj na mastocytoch a bazofiloch; výsledkom je inhibícia ich degranulácie (59, 62). Sledovanie hladín Ig4 protílátok je preto odrazom úspešne špecifickej imunoterapie. Dokonca po jej ukončení hladiny IgG4 síce klesnú na pôvodnú úroveň, ale tieto zostávajú stále protektívne (63).

LITERATÚRA

1. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 2010; 10(7):490-500.
2. Li X, Zheng Y. Regulatory T cell identity: formation and maintenance. Trends Immunol 2015; 36(6):344-53.
3. Van Gool F, Nguyen MLT, Mumbach MR, et al. A Mutation in the Transcription Factor FOXP3 Drives T Helper 2 Effector Function in Regulatory T Cells. Immunity 2019; 50(2):362-77 e6.
4. Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. Immunity 2008; 28(1):100-11.
5. Owen DL, Mahmud SA, Sjaastad LE, et al. Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs. Nat Immunol 2019; 20(2):195-205.
6. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet 2001; 27(1):20-1.

7. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3):1151-64.
8. Tsuda M, Torgerson TR, Selmi C, et al. The spectrum of autoantibodies in IPEX syndrome is broad and includes anti-mitochondrial autoantibodies. *J Autoimmun* 2010; 35(3):265-8.
9. Walker LSK. CTLA-4 and Autoimmunity: New twists in the tale. *Trends Immunol* 2015; 36(12):760-2.
10. Buc M. Charakteristika a funkcia ILC-buniek za fyziologických a patologických podmienok. *Alergie* 2017; 19(1): 24-30.
11. Buc M. Heterogenita lymfocytov ako ústredných operačných jednotiek imunitného systému. *Vnitř Lék* 2019; 65(2), 86-97.
12. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FOXP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1701-11.
13. Akkaya B, Oya Y, Akkaya M, et al. Regulatory T cells mediate specific suppression by depleting peptide-MHC class II from dendritic cells. *Nat Immunol* 2019; 20(2):218-31.
14. Rissiek A, Baumann I, Cuapio A, et al. The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J Autoimmun* 2015; 58:12-20.
15. Shevach EM. Mechanisms of FOXP3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009; 30(5):636-45.
16. Liu Z, Gerner MY, Van Panhuys N, et al. Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. *Nature* 2015; 528(7581):225-30.
17. Carrizosa E, Mempel TR. Immunology: In the right place at the right time. *Nature* 2015; 528(7581):205-6.
18. Panduro M, Benoist C, Mathis D. Tissue Tregs. *Annu Rev Immunol* 2016; 34:609-33.
19. Dominguez-Villar M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2018; 19(7):665-73.
20. Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally induced tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol* 2013; 4:232.
21. Manzanillo P, Eidenschenk C, Ouyang W. Deciphering the crosstalk among IL-1 and IL-10 family cytokines in intestinal immunity. *Trends Immunol* 2015; 36(8):471-8.
22. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* 2014; 513(7519):564-8.
23. Feng Y, Arvey A, Chinen T, et al. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the FOXP3 locus. *Cell* 2014; 158(4):749-63.
24. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3(+) Regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. *Immunity* 2019;50(2):302-16.
25. Yadav M, Louvet C, Davini D, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med* 2012; 209(10):1713-22, S1-19.
26. Zhao H, Liao X, Kang Y. Tregs: Where we are and what comes next? *Front Immunol* 2017; 8:1578.
27. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, 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(7):3433-41.
28. Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, et al. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005; 4(6):351-63.
29. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system. *Autoimmun Rev*. 2010; 10(2):112-5.
30. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 2013; 19(6):739-46.
31. Magnani CF, Alberigo G, Bacchetta R, et al. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur J Immunol* 2011; 41(6):1652-62.
32. Visperas A, Vignali DA. Are regulatory T cells defective in type 1 diabetes and can we fix them? *J Immunol* 2016; 197(10):3762-70.
33. Chavele KM, Ehrenstein MR. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 2011; 585(23):3603-10.
34. Balandina A, Lecart S, Darteville P, et al. Functional defect of regulatory CD4⁽⁺⁾CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood* 2005; 105(2): 735-41.
35. Kumar M, Putzki N, Limmroth V, et al. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006; 180(1-2):178-84.
36. Buc M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 2013; Article ID 963748.
37. Yamada A, Arakaki R, Saito M, et al. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2016; 22(7):2195-205.
38. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2004; 103(9):3428-30.
39. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* 2015; 45(2):344-55.
40. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾FOXP3⁽⁺⁾ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(12):849-59.
41. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:329-60.
42. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases – elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 2014; 27:16-25.
43. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007; 450(7171):903-7.
44. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014; 41(1):49-61.
45. Solito S, Bronte V, Mandruzzato S. Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* 2011; 90(1):31-6.
46. Bucová M., Klučková K, Buc, M. Mechanizmy imunitného systému v boji proti nádorom a príčiny ich zlyhania. *Onkológia* 2018; 13(2): 87-93.
47. Klatzmann D, Abbas AK. The promise of low-dose interleukin-2 therapy for autoimmune and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(5):283-94.
48. Trotta E, Bessette PH, Silveria SL, et al. A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism. *Nat Med* 2018; 24(7):1005-14.

49. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2015; 7(315):315ra189.
50. Brunstein CG, Miller JS, McKenna DH, et al. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect. *Blood* 2016; 127(8):1044-51.
51. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015; 42(4):607-12.
52. Ray A, Khalil MI, Pulakanti KL, et al. Mature IgD(low/-) B cells maintain tolerance by promoting regulatory T cell homeostasis. *Nat Commun* 2019; 10(1):190.
53. Yang M, Rui K, Wang S, et al. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 2013; 10(2):122-32.
54. Maravillas-Montero JL, Acevedo-Ochoa E. Human B regulatory cells: the new players in autoimmune disease. *Rev Invest Clin* 2017; 69(5):243-6.
55. Oleinika K, Rosser EC, Matei DE, et al. CD1d-dependent immune suppression mediated by regulatory B cells through modulations of iNKT cells. *Nat Commun* 2018; 9(1):684.
56. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J Clin Invest* 2017; 127(3):772-9.
57. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, et al. A regulatory feedback between plasmacytoid dendritic cells and regulatory B cells is aberrant in Systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2016; 44(3):683-97.
58. Van de Veen W. The role of regulatory B cells in allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2017;17(6):447-52.
59. Davies AM, Sutton BJ. Human IgG4: a structural perspective. *Immunol Rev* 2015; 268(1):139-59.
60. Achour A, Simon Q, Mohr A, et al. Human regulatory B cells control the TFH cell response. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(1):215-22.
61. Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 2002; 105(1):9-19.
62. Santos AF, James LK, Bahnson HT, et al. IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135(5):1249-56.
63. James LK, Bowen H, Calvert RA, et al. Allergen specificity of IgG(4)-expressing B cells in patients with grass pollen allergy undergoing immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130(3):663-70 e3.

*prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.
Imunologický ústav LF UK
Odborárske nám. 14
813 72 Bratislava
e-mail: milan.buc@fmed.uniba.sk*