

## РЕГУЛАТОРНИ Т ЛИМФОЦИТИ

Арсовић А.<sup>1</sup>, Радић И.<sup>2</sup>, Савић С.<sup>3</sup>, Илић Б.<sup>4</sup>, Баскић Д.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

<sup>2</sup>Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

<sup>3</sup>Институт за хистологију и ембриологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

<sup>4</sup>Дом здравља „Др Ђорђе Лазич“, Служба хитне медицинске помоћи, Сомбор

<sup>5</sup>Институт за микробиологију и имунологију, Медицински факултет Крагујевац

## REGULATORY T LYMPHOCYTES

Арсовић А.<sup>1</sup>, Радић И.<sup>2</sup>, Савић С.<sup>3</sup>, Илић Б.<sup>4</sup>, Баскић Д.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Institute of microbiology and immunology, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

<sup>2</sup>Institute of pathological physiology, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

<sup>3</sup>Institute of histology and embryology, Medical Faculty Priština, Kosovska Mitrovica

<sup>4</sup>Health Center "Dr Djordje Lazic", Department of the urgent medical assistance, Sombor

<sup>5</sup>Institute for microbiology and immunology, Medical Faculty Kragujevac

## SUMMARY

Regulatory T cells represent unique CD4+CD25+ population of T lymphocytes, which are involved in many immunological events. These cells have very important role in maintaining peripheral tolerance, prevention of autoimmune diseases, in immunological respond to infection, particularly by intracellular microorganisms as well as in a process of tumorigenesis. There are two populations of regulatory T cells: natural regulatory T cells - nTregs and adaptive, inducible regulatory - iTregs. They differ between each other in accordance to the place of creation, in accordance to the specificity of the T cell receptor, as well as the action mechanism. nTregs and the other T cells arise in thymus, which provides specific inductive environment for maturation and immunological education of progenitor cells to immunocompetent T cells. iTregs arise on periphery from the conventional CD4+ T cells after stimulation by antigen under the different conditions. There is number of subpopulations of iTregs and the most important are Tr1 and Th3 cells. Tr1 cells produce big amounts of interleukin 10 (IL-10), and they are called IL-10-secretory regulatory cells, whereas Th3 cells are necessary for maintenance of peripheral tolerance to mucous surfaces, through their dominant cytokine TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) and they are most widely spread in the mucosa of the digestive tract. Previous researches have shown that regulatory T cells achieve their suppressor activity via inhibitory cytokines, cytolysis, and induction of metabolic disorders and modulation of maturation or function of dendritic cells.

**Key words:** regulatory T cells (Tregs); natural regulatory T cells (nTregs); adoptable; inducible regulatory T cells (iTregs)

## САЖЕТАК

Регулаторни Т лимфоцити (енг. regulatory T cells - Tregs), представљају јединствену CD4+CD25+ популацију Т лимфоцита, укључену у многобројна имунолошка збивања. Ове ћелије имају значајну улогу у одржавању периферне толеранције, превенцији аутоимунских обољења, у имунском одговору на инфекцију, нарочито интрацелуларним микроорганизмима, као и у процесу туморогенезе. Постоје две популације регулаторних Т лимфоцита: природни регулаторни Т лимфоцити - (енг. natural regulatory T cells - nTregs) и адаптивни, индуцибилни регулаторни Т лимфоцити - (енг. inducible regulatory T cells - iTregs). Оне се међусобно разликују по месту настанка, по специфичности Т-ћелијског рецептора, као и механизму деловања. nTregs као и сви Т лимфоцити, настају у тимусу, који обезбеђује специфичну индуктивну средину за сазревање и имунолошку едукацију прогениторних ћелија у имунокомпетентне Т лимфоците. iTregs настају на периферији од конвенционалних CD4+ Т лимфоцита након стимулације антигеном под различитим условима. Постоји више субпопулација iTregs, а најзначајније су Tr1 и Th3 ћелије. Tr1 ћелије продукују велике количине интерлеукина 10 (IL-10), па се називају и IL-10-секретујуће регулаторне ћелије, док су Th3 ћелије неопходне за одржавање периферне толеранције на мукозним површинама, посредством њиховог доминантног цитокина TGF- $\beta$  (енг. Transforming growth factor - beta), а најраспрострањеније су у мукози дигестивног тракта. У досадашњим истраживањима је показано да регулаторни Т лимфоцити своју супресорску активност остварују посредством инхибиторних цитокина, цитолизом, индукцијом метаболичких поремећаја, као и модулацијом матурације или функције дендритичних ћелија.

**Кључне речи:** регулаторни Т лимфоцити (Tregs); природни регулаторни Т лимфоцити (nTregs); адаптивни; индуцибилни регулаторни Т лимфоцити (iTregs)

### Увод и историјат

На постојање посебног субсета Т лимфоцита, који су способни да супримирају имунски одговор први је указао Ричард Гершон (Richard Gershon) раних седамдесетих година. Назвао их је супресорски Т лимфоцити (1). Међутим, због тешкоћа у доказивању њиховог постојања, услед одсуства модерних целуларних и молекуларних техника, концепт о њиховом постојању бива заборављен и приписан феноменологији (2).

Симон Сакагуши (Shimon Sakaguchi) и сарадници 1995 обнављају концепт супресије индуковане Т ћелијама, идентификујући јединствену CD4+CD25+ популацију Т лимфоцита која настаје у тимусу трећег дана неонаталног развоја (3). Еуфемистички су их назвали регулаторни Т лимфоцити - (енг. regulatory T cells - Tregs), да би се избегао задржан скептицизам везан за супресорске Т лимфоците. Ово откриће враћа заинтересованост за концепт супресије индуковане Т лимфоцитима, а откриће Foxp3 транскрипционог фактора (енг. forkhead box P3 transcription factor), који је кључни фактор за настанак, развој и функцију Tregs (4) их ставља у епицентар имунолошких истраживања.

### Подела регулаторних Т лимфоцита

Регулаторни Т лимфоцити представљају есенцијалне ћелије за одржавање периферне толеранције, превенцију аутоимунских болести, у туморској имунологији, и у контроли хроничних инфламаторних болести. Постоје две популације регулаторних Т лимфоцита: природни регулаторни Т лимфоцити - (енг. natural regulatory T cells - nTregs) и адаптивни, индуцибилни регулаторни Т лимфоцити - (енг. inducible regulatory T cells - iTregs) (5).

Ове две популације лимфоцита се по много чему разликују. Пре свега по месту настанка, а затим и по специфичности њиховог Т ћелијског рецептора и механизму деловања. nTregs настају у тимусу у току процеса централне толеранције и након миграције из тимуса су потпуно спремни за извршавање своје функције, док iTregs настају на периферији од конвенционалних CD4+ Т лимфоцита након стимулације антигеном, под различитим условима (6).

### Настанак природних Т лимфоцита

За сазревање како свих Т лимфоцита, тако и nTregs неопходан је њихов боравак у тимусу који обезбеђује одговарајућу индуктивну средину за сазревање прекурзорних ћелија пристиглих из коштане сржи у имунокомпетентне Т лимфоците. У тимусу, тимоцити постижу имунолошку едукацију на бази интеракција са стромалним ћелијама тимуса, које на својој површини исказују сопствене пептиде у асоцијацији са сопственим МНС (енг. major histocompatibility complex) молекулима (7). Експресију сопствених пептида контролише аутоимунски регулатор ген - Aire (енг. autoimmune regulator gene) (8), услед чега је његова експресија критична за успостављање централне толеранције (9), а мутација Aire гена доводи до аутоимуног полиендокриног синдрома (9).

У току матурације тимоцити чији Т ћелијски рецептор препознаје комплекс сопствених антигенских пептида и сопствених МНС молекула на површини кортикалних тимусних епителних ћелија (енг. cortical thymic epithelial cells - cTEC), примају "спасоносни" сигнал за даљи развој тј., подлежу процесу позитивне селекције. Тимоцити који нису препознали комплекс сопственог антигенског пептида и сопственог МНС молекула, не примају "спасоносни" сигнал и подлежу апоптози. Ова смрт се назива још и смрт услед "заостављања" (енг. death by neglect). Пре, у току и након процеса позитивне селекције тимоцити такође препознају сопствене антигенске пептиде у комплексу са сопственим МНС молекулима на површини тимусних дендритичних ћелија (енг. thymic dendritic cells - TDC) и на површини медуларних тимусних епителних ћелија (енг. medullary thymic epithelial cells - mTEC). Уколико препознавање буде високо -афинитетно, долази до клонске делеције тимоцита тј. они подлежу негативној селекцији. Позитивна и негативна селекција су централни механизми индукције толеранције којима се обезбеђује уклањање или инактивација потенцијално аутореактивних Т лимфоцита (10).

Неки потенцијално аутореактивни тимоцити избегавају негативну селекцију и подлежу процесу неделеционе централне толеранције, при чему настају високо-афинитетни регулаторни Т лимфоцити. У овом тренутку намеће се питање како ови високо-афинитетни, потенцијално аутореактивни тимоцити избегавају негативну селекцију? Лиу (Yong-Jun Liu) објашњава да у току њиховог раног линијског усмеравања, у контакту са cTEC започиње диферентовање тимоцита ка nTregs. Они најпре препознају комплекс сопствени антигенски пептид/МНС молекул на cTEC умерено-високим афинитетом и то представља процес примарне позитивне селекције у току њихове матурације. У даљем току они се сусрећу са медуларним дендритичним ћелијама (енг. medullary dendritic cells - mDC), услед чега се индукује експресија Foxp3 транскрипционог фактора, након чега зрели nTregs напуштају тимус и одлазе на периферију. Интеракција са mDC представља процес секундарне позитивне селекције у току њиховог сазревања (11). Зашто ове mDC уместо негативне селекције високоафинитетним потенцијално аутореактивним тимоцитима испоручују сигнал за даље преживљавање? Ватанабе (Nori-hiko Watanabe) наводи да су то дендритичне ћелије које су предходно активирани тимусним стромалним лимфопоетином (енг. thymic stromal lymphopoietin - TSLP), кога производе епителне ћелије Хасалових телашаца, а који преусмерава деловање mDC, тако да оне уместо негативне селекције индукују секундарну позитивну селекцију (12).

Постоје студије које се супростављају овој за сада прихваћеној теорији, наводећи да је кортекс тимуса сасвим довољан за индукцију Foxp3 транскрипционог фактора и развој nTregs (13). Друге, пак, студије наводе да у једноструко позитивној популацији тимоцита (CD4+CD8-) постоји субпопулација која високоекспримира CD25 молекула, те да она представља ране линијске прекурсоре nTregs. Ови прекурсори се јављају током ране фазе развоја и способни су да експримирају Foxp3

без даљег ангажовања T ћелијског рецептора, захтевајући једино стимулацију интерлеукинима IL-2 и IL-15 (14).

#### **Настанак адаптивних, индуцибилних регулаторних T лимфоцита**

iTregs настају на периферији од конвенционалних CD4+ T лимфоцита након стимулације антигеном под различитим условима. До сада је идентификовано више популација iTregs, које се пре свега разликују по профилу цитокина које секретују. Две главне субпопулације iTregs су Tr1 и Th3 ћелије (15). Tr1 ћелије су први пут описане код пацијената са тешком комбинованом имунодефицијенцијом SCID (енг. severe combined immunodeficiency), код којих су изоловани CD4+ T лимфоцити који продукују високе количине IL-10 и IL-5, уз мањи ниво продукције IFN- $\gamma$  и IL-2 и без продукције IL-4 (16). Убрзо након овог открића, Херв Гроукс (Herv Groh) и сарадници *in vitro* активацијом CD4+ T лимфоцита у присуству високих доза IL-10, добијају T ћелијски клон који продукује високе количине IL-10, TGF- $\beta$  и IL-5, уз знатно мање количине IFN- $\gamma$  и IL-2 и уз одсуство IL-4. Тада су ове ћелије назване Tr1 ћелије (17). Кључна особина ових ћелија је да продукују велику количину IL-10, путем којег остварују своју супресивну функцију. Разликују се од Th2 ћелија зато што уз продукцију IL-10 не продукују IL-4, али и од Th1 ћелија зато што је количина IFN- $\gamma$  коју продукују веома мала у односу на Th1 ћелије (18).

Tr1 ћелије конститутивно не експримирају Foxp3 транскрипциони фактор и настају у одсуству nTregs (19). Њихов пролиферативни капацитет је мали (16), али је показано да у присуству IL-15 у комбинацији са IL-2 долази до значајне експанзије Tr1 ћелија. Ова студија указује да је IL-15 важан фактор раста у *in vitro* условима, а вероватно и значајан фактор одржавања ових ћелија у *in vivo* условима (20).

Након првог извештаја и карактеризације Tr1 ћелија, урађен је велики број експеримената за њихову поновну идентификацију. У њима је утврђен велики број IL-10 продукујућих ћелија са регулаторном функцијом, али ове iTregs нису увек биле окарактерисане као Tr1 ћелије због њиховог различитог цитокиноског профила (19,21,22,23). Заједничка одлика свих генерисаних ћелија је висока продукција IL-10, а девијације у продукцији осталих цитокина се могу приписати различитим експерименталним условима коришћеним за индукцију iTregs. Услед овог предложено је да се ћелије које продукују IL-10 и имају регулаторну улогу једним именом називају IL-10- секретујуће регулаторне ћелије (24,25). У почетку се тврдило да све оне настају од највиших T лимфоцита, мада има студија које наводе да ове регулаторне ћелије настају од потпуно диферентованих Th1 или Th2 T лимфоцита који након хроничне стимулације одржавају продукцију IL-10, уз изостанак секреције осталих ефекторних цитокина (25,26)

Th3 ћелије су првобитно откривене код мишева којима је оралним путем индукована толеранција на базни протеин мијелина (енг. myelin basic protein-MBP). У овом експерименту Th3 ћелије посредством TGF- $\beta$ , који је њихов доминантни цитокин, супримирају наста-

нак аутоимунског енцефаломијелитиса (27). У каснијим експериментима су ове ћелије идентификоване и код пацијената оболелих од мултипле склерозе, који су предходно такође орално толеризовани на MBP и протеолипидни протеин (28). Th3 ћелије производе велике количине TGF- $\beta$ , уз варијабилне, али ипак значајне количине IL-10 и IL-4. Њихов цитокински профил их јасно одваја од Tr1 ћелија као и од Th1 и Th2 ћелија (29). Th3 ћелије посредством њиховог доминантног цитокина TGF- $\beta$ , критичне су за одржавање периферне толеранције на мукозним површинама, а мукоза интестиналног тракта се сматра "привилегованим местом" за настанак Th3 ћелија (30).

Скорашње студије аргументују да су и ефекторне Th1 ћелије веома важан извор IL-10. Оне се јасно одвајају од осталих IL-10 продукујућих ћелија, укључујући Th2, nTregs, iTregs, као и од ћелија урођене имуности. Студије, иако неочекивано, доказују да ефекторне Th1 ћелије које конститутивно продукују IFN- $\gamma$  продукују и IL-10. Продукција IL-10 представља стадијум у току њиховог нормалног, уредног циклуса диференцијације. Предпоставља се да је циљ ове неочекиване копродукције ублажавања, боље речено превенирање патолошких консеквенци неконтролисаног Th1 имунског одговора. Ово наводи на закључак да Th1 ћелије поред ефекторне функције, такође поседују и ауторегулаторну активност (31,32). Након ових студија ипак остаје нејасно, да ли ефекторне Th1 ћелија које продукују IFN- $\gamma$  и IL-10 представљају само стадијум или пак крајњу тачку диференцијације ових ћелија, или је то посебана популација "IL-10, IFN- $\gamma$  копродукера" која настаје од највиших T лимфоцита под одређеним условима.

#### **Како регулаторни T лимфоцити остварују своју супресорску активност?**

Молекуларни механизми супресије индуковане регулаторним T лимфоцитима су још увек недовољно јасни. Најприхваћенија теорија је да је за супресивну активност неопходан контакт између имунских ћелија, мада има и студија које тврде супротно тј., да је у питању механизам супресије посредован медијаторима и независан од контакта. Најновији приступ указује, да је то ипак један процес који захтева ангажовање оба пута (33). За сада су, пре свега из дидактичких разлога механизми супресије регулаторних T лимфоцита подељени у четири базичне групе деловања (34).

#### *Супресија посредована инхибиторним цитокинима*

Бројне студије су потврдиле да су главни медијатори супресије индуковане Tregs, цитокини IL-10 и TGF- $\beta$ . Показано је да обе популације регулаторних T лимфоцита и nTregs и iTregs своју регулаторну улогу могу испољити продукцијом ових цитокина (35), мада је у неким недавним експериментима показано да је мембранска, али не и солубилна форма TGF- $\beta$  одговорна за имуносупресију посредовану Tregs (36). У овим експериментима је доказано да активирани Tregs испољавају костимулаторни молекул CTLA-4 (енг. cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) и мембрански TGF- $\beta$  који у кон-

такту са својим лигандима на циљаним ћелијама заустављају даљу активацију ефекторских лимфоцита. Такође, висока супресивна активност је доказана и за скоро откривени  $\text{IL-35}$  (37).

#### *Супресија посредована цитоллизом*

Иако је цитолитична активност до сада приписивана само цитотоксичним  $\text{CD8}^+$  Т лимфоцитима и урођено убилачким NK ћелијама (енг. natural killer), сада се зна да и Tregs имају цитолитичну активност, обзиром да је показано да и хумане Tregs експримирају гравизим Б(38).

#### *Супресија посредована метаболичким поремећајима*

Супресија посредована метаболичким поремећајима, односи се пре свега на потрошњу  $\text{IL-2}$  неопходног за пролиферацију ефекторних Т лимфоцита. Обзиром да Tregs високо експримирају  $\text{CD25}$  молекула, који представља  $\alpha$  ланац рецептора за  $\text{IL-2}$ , а уз то саме не продукују  $\text{IL-2}$ , то им омогућава да потроше сав  $\text{IL-2}$  који продукују ефекторни Т лимфоцити чиме ефекторне Т лимфоците уведе у апоптозу услед ускраћивања  $\text{IL-2}$  (39).

Поред описаног, постоји још неколико механизма супресије посредоване метаболичким поремећајима. Најважнији међу њима је генерисање перичелуларног аденозина, активношћу  $\text{CD39}$  и  $\text{CD73}$  ектоензима и субсеквентно везивање аденозина за аденозин рецептор 2А на ефекторним ћелијама што инхибира њихову функцију (40).

#### *Супресија посредована модулацијом матурације или функције дендритичних ћелија*

Овај блик супресије, остварује се интеракцијом између костимулаторног молекула  $\text{CTLA-4}$ , конститутивно експримираног на Tregs и костимулаторних протеина  $\text{CD80}$  и  $\text{CD86}$  експримираних на дендритичним ћелијама. Доказано је да ова интеракција може, пре свега, редуковати способност дендритичних ћелија да активирају конвенционалне Т лимфоците, и то тако што на незрелим дендритичним ћелијама инхибира експресију  $\text{CD80/CD86}$ , а на зрелим дендритичним ћелијама смањује већ постигнуту експресију ових молекула (41). Такође, ова интеракција може индуковати синтезу индоламин диоксигеназе (IDO), која катализује синтезу кинуренина из триптофана. Кинуренин има токсично дејство на Т лимфоците који се налазе у близини дендритичних ћелија, изазивајући на тај начин имunosупресију (42).

#### **Улога регулаторних Т лимфоцита у инфекцији**

Улога регулаторних Т лимфоцита у имунском одговору на инфекцију, иако контроверзна по многим питањима, недвосмислено је од великог значаја. Белкаид (Yasmine Belkaid) и сарадници су на експерименталном моделу перзистентне инфекције изазване протозоом *Leishmania major*, показали да се Tregs акумулирају на месту инфекције и да супримирају способност ефекторних

Т лимфоцита да комплетно елиминирају паразит, одржавајући на тај начин перзистентну инфекцију. У истој студији је доказано да комплетна ерадикација паразита доводи до губитка имунског одговора на реинфекцију, док перзистентна инфекција резултира протективним имунским одговором на субсеквентно излагање истом паразиту (43). Поред улоге у одржавању имунског одговора на реинфекцију, Tregs супримирају екцесивни имунски одговор, и на тај начин превенирају патолошки имунски одговор који доводи до општећења ткива. Ова улога Tregs је јасно илустрована у експерименталном моделу запаљенске болести црева код SCID мишева (44). Слично, уклањање Tregs у херпес симплекс вирусној инфекцији није корисно за домаћина, зато што убрзава ширење вируса и доводи до следствене смрти (45). Поред ових, бројне студије указују на круцијалну улогу Tregs у оркестрирању имунског одговора у смислу превенције реактивације инфекције одржавањем сталног имунског одговора на патогене, али без екцесивног имунопатолошког општећења домаћина (46,47,48).

Механизам којим Tregs управљају имунским одговором против многих, пре свега интрацелуларних микроорганизама још увек није довољно јасан. Имуноски одговор на интрацелуларне микроорганизме резултира продукцијом многих цитокина, међу којима доминантно инхибиторну улогу има  $\text{IL-10}$  (49). Претпоставља се да  $\text{IL-10}$  пре свега супримира макрофаге да фагоцитишу интрацелуларне паразите, што омогућава формирање презервативних форми микроорганизама у макрофагима и одржавање константног протективног имунског одговора (50).

## **ЗАКЉУЧАК**

И поред бројних студија које на убедљив и мање убедљив начин указују на постојање разноликих поткласа регулаторних Т лимфоцита, морамо да поставимо једно питање: да ли регулаторни Т лимфоцити заиста чине посебну популацију Т хелперских ћелија. Заиста, оригинална дефиниција Т помоћничких поткласа ( $\text{Th1}$  и  $\text{Th2}$ ) је базирана на стабилном цитокинском профилу који је независан од врсте стимулације или експерименталних услова. Ниједна накнадно описана поткласа хелперских Т лимфоцита (Tregs,  $\text{Th17}$ ,  $\text{Th9}$ ) није потврђена по овако ригорозним условима. Но, и поред тога, чињеница је да Т лимфоцити који продукују високе концентрације  $\text{IL-10}$  имају значајну улогу у регулацији имунског одговора, поготову на интрацелуларне микроорганизме.

Која је њихова права улога у инфекцији? Да ли је регулација јачине имунског одговора у циљу спречавања комплетне елиминације микроорганизама и на тај начин одржавања протективног имунског одговора или пак превенирања екцесивног имунопатолошког општећења? Да ли можда микроорганизми развијају механизме којима избегавају имунски одговор и на тај начин спречавају елиминацију из организма домаћина? И без одговора на та питања, јасно је да фини баланс који регулаторни Т лимфоцити обезбеђују на месту инфекције одражава еволутивни компромис између микроорганизама и домаћина, али у чију корист?

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA. Suppressor T cells. *The Journal of Immunology* 1972; 108: 586-590.
2. Green DR, Webb DR. Saying the "S" word in public. *Immunology Today* 1995; 155: 1151-1164.
3. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 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. *Journal Immunology* 1995; 155: 1151-1164.
4. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 2003; 4: 337-342.
5. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 253-257.
6. Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. Regulatory T cells: development, function, and role in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2005; 4: 351-363.
7. Ladi E, Yin Z, Chtanova T, Robey EA. Thymic microenvironments for T-cell differentiation and selection. *Nature Immunology* 2006; 7: 338-343.
8. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley JS von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the Aire protein. *Science* 2002; 298: 1395-1401.
9. Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annual Review Immunology* 2006; 24: 571-606.
10. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 772-782.
11. Liu YJ. A unified theory of central tolerance in the thymus. *Trends Immunology* 2006; 27: 215-221.
12. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005; 436: 1181-1185.
13. Liston A, Nutsch KM, Farr AG, Lund JM, Rasmussen JP, Koni PA, Rudensky AY. Differentiation of regulatory Foxp3+ T cells in thymic cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 2008; 105: 11903-11908.
14. Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T-cell development. *Immunity* 2008; 28: 100-111.
15. Shevach ME. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T-regulatory cells. *Immunity* 2006; 25: 195-201.
16. Bacchetta R, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE. High levels of interleukin 10 in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *Journal Experimental Medicine* 1994; 172: 493-502.
17. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevent colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742.
18. Bacchetta R, de Waal Malefijt R, Yssel H, Abrams J, de Vries JE, Spits H, Roncarolo MG. Host-reactive CD4+ and CD8+ T cell clones isolated from a human chimera produce IL-5, IL-2, IFN-gamma and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor but not IL-4. *The Journal of Immunology* 1990; 144: 902-908.
19. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. IL-10-secreting regulatory T-cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal immunology*. 2004; 172: 5986-5993.
20. Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordignon C, Narula S, Roncarolo MG. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *European Journal Immunology* 2002; 32: 2237-2245.
21. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *Journal Clinical Investigation* 2004; 114: 1372-1378.
22. Boussiotis AV, Tsai YE, Yunis JE, Thim S, Delgado CJ, Dasher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *Journal Clinical Investigation* 2000; 105: 1317-1325.
23. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. 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. *Journal Experimental Medicine* 2002; 195: 603-616.
24. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews* 2006; 212: 28-50.
25. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10 secreting regulatory T-cells in allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 271-283.
26. O'Garra A, Viera P. Th1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7: 425-428.
27. Chen Y, Kuchroo VK, Indobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994; 265: 1237-1240.
28. Fukaura H, Kent SC, Pietruszewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *Journal Clinical Investigation* 1996; 98: 70-77.
29. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews* 2001; 182: 207-214.
30. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology* 2006; 27: 232-241.
31. Jankovic D, Kullberg CM, Feng GC, Goldszmid RS, Collazo MC, Wilson M, Wynn AT, Kamanaka M, Flavell AR, Sher A. Conventional T-bet+ Foxp3- Th1 cells are major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *Journal Experimental Medicine* 2007; 204: 273-283.
32. Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *Journal Experimental Medicine* 2007; 204: 239-243.
33. Vignali AD, Collison WL, Workman JC. How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology* 2008; 8: 523-532.
34. Vignalli AD. How many mechanisms do regulatory T cells need? *European Journal Immunology*. 2008; 38: 908-911.
35. Joetham A, Takada K, Taube C, Miyahara N, Matsubara S, Rha YH, Dakhama A, Gelfand WE. Naturally Occurring Lung CD4+CD25+ T Cell Regulation of Airway Allergic Responses Depends on IL-10 Induction of TGF-beta. *Journal Immunology* 2007; 178: 1433-1442.
36. Xia ZW, Xu LQ, Zhong WW, Wei JJ, Li NL, Shao J, Li LJ, Yu SC, Zhang LJ. Heme Oxygenase-1 Attenuates Ovalbumin-

- Induced Airway Inflammation by Up-Regulation of Foxp3 T-Regulatory Cells, Interleukin-10, and Membrane-Bound Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *American Journal of Pathology* 2007; 171: 1904-1914.
37. Collison LW, Workman CJ, Kuo TK, Boyd K, Wang Y, Vignali K, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DAA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T cell function. *Nature* 2007; 450: 566-569.
  38. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR, Ley TJ. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cells-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; 27: 635-646.
  39. Pandiyan P, Zheng I, Ishihara S, Reed J, Lendaro MJ. CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T-cells. *Nature Immunology* 2007; 8: 1353-1362.
  40. Trang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cells: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology* 2008; 9: 239-244.
  41. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* 2008; 322: 271-275.
  42. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 762-774.
  43. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002; 420: 502-507.
  44. Singh B, Read S, Asseman C, Malmström V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunological Reviews* 2001; 182: 190-200.
  45. Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 2008; 320: 1220-1224.
  46. Netea MG, Suttmüller R, Herman C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. Toll-like receptor-2 suppressing immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *Journal of Immunology* 2004; 172: 3712-3718.
  47. Kursar M, Koch M, Mittrucker HW, Nouailles G, Bonhagen K, Kamradt T, Kaufman SH. Cutting edge: regulatory T-cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* 2007; 178: 2661-2665.
  48. Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T-cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771-778.
  49. Belkaid Y. Role of regulatory T cells during infections. *European Journal of Immunology* 2008; 38: 918-921.
  50. Sakaguchi S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nature Immunology* 2003; 4: 10-11.