

LAVORO ORIGINALE

Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) come marker di cellule T regolatorie umane: espansione della sottopopolazione cellulare GITR⁺CD25⁻ in pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico*

Glucocorticoid induced TNFR-related protein (GITR) as marker of human regulatory T cells: expansion of the GITR⁺CD25⁻ cell subset in patients with systemic lupus erythematosus

A. Alunno¹, G. Nocentini², O. Bistoni¹, R. Bianchini², E. Bartoloni Bocci¹, C. Riccardi², R. Gerli¹

¹SSD di Reumatologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Perugia;

²Sezione di Farmacologia, Tossicologia e Chemioterapia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Perugia

SUMMARY

Objectives: Regulatory T cells (T_{REG}) represent a T cell subset able to modulate immune response by suppressing autoreactive T-lymphocytes. The evidence of a reduced number and an impaired function of this cell population in autoimmune/inflammatory chronic diseases led to the hypothesis of its involvement in the pathogenesis of these disorders. Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR) is a well known marker of murine T_{REG} cells, but little is known in humans. The aim of this study was to investigate the characteristics of T_{REG} cells in systemic lupus erythematosus (SLE) and the potential role of GITR as marker of human T_{REG} .

Methods: Nineteen SLE patients and 15 sex- and age-matched normal controls (NC) were enrolled. $CD4^+$ T cells were magnetic sorted from peripheral blood by negative selection. Cell phenotype was analyzed through flow-cytometry using primary and secondary antibodies and real time polymerase-chain reaction (PCR) using TaqMan probes.

Results: The $CD25^{high}GITR^{high}$ subset was significantly decreased in SLE patients with respect to NC ($0.37\pm 0.21\%$ vs $0.72\pm 0.19\%$; $p<0.05$). On the opposite, the $CD25^-GITR^{high}$ cell population was expanded in the peripheral blood of SLE patients (3.5 ± 2.25 vs $0.70\pm 0.32\%$, $p<0.01$). Interestingly, FoxP3 at mRNA level was expressed in both $CD25^-GITR^{high}$ and $CD25^{high}GITR^{high}$ cells, suggesting that both cell subsets have regulatory activity.

Conclusions: $CD4^+CD25^-GITR^{high}$ cells are increased in SLE as compared to NC. The expression of high level of GITR, but not CD25, on FoxP3+ cells appears to point to a regulatory phenotype of this peculiar T cell subset.

Reumatismo, 2010; 62(3):195-201

INTRODUZIONE

Le cellule T regolatorie (T_{REG}) rappresentano un sottotipo T cellulare in grado di modulare la risposta immunitaria e numerosi studi sembrano or-

mai supportare l'ipotesi che una loro alterazione, in termini di riduzione numerica o diminuita funzionalità soppressiva, potrebbe essere coinvolta nella patogenesi di malattie autoimmunitarie sistemiche ed infiammatorie croniche.

L'elevata espressione sulla loro superficie di una molecola recettoriale nota come CD25 (IL2R α), non solo ne ha permesso l'isolamento prima nel topo e successivamente nell'uomo, ma ne ha caratterizzato dal punto di vista funzionale il loro peculiare fenotipo (1, 2).

Successivamente, altre molecole di superficie sono state identificate come *markers* delle T_{REG} tra

*Lavoro premiato al XLVI Congresso SIR, Rimini 2009.

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Roberto Gerli

SSD di Reumatologia

Via Enrico dal Pozzo, Padiglione X

06122 Perugia

E-mail: gerli@unipg.it

cui il *cytotoxic T lymphocyte antigen-4* (CTLA-4), il CD127 ed il *glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein* (GITR) (3, 4). In realtà il loro significato come molecole di superficie specifiche delle T_{REG} è ancora controverso. Ciò è dovuto in parte al fatto che di alcune di esse, per quanto riconosciuti *markers* di cellule T_{REG} nel topo, non se ne conosce ancora il ruolo nell'uomo, come nel caso di GITR. Inoltre, l'incremento di espressione di tali molecole, come CD25, CTLA-4 e GITR, anche sulla superficie di cellule T attivate ha reso difficile l'interpretazione dei primi studi che li hanno utilizzati quali unici *markers* di cellule T_{REG} . In tal senso, la scoperta di Foxp3, il fattore di trascrizione che si ritiene essere espresso in modo specifico dalle T_{REG} , ha permesso di caratterizzare in maniera più definita questa popolazione cellulare. FoxP3, precedentemente noto come JM2, fu inizialmente identificato come il gene le cui mutazioni si associavano alla comparsa di una sindrome autoimmune murina, la X-linked autoimmunity-allergic dysregulation (XLAAD) syndrome, successivamente identificata anche nell'uomo e nota come Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked (IPEX) syndrome (5, 6). Studi successivi hanno quindi dimostrato che le T_{REG} murine ed umane esprimono costitutivamente FoxP3 e, dato ancora più interessante, hanno evidenziato che la presenza di tale gene è necessaria affinché una cellula progenitrice T venga indirizzata, nelle fasi precoci dello sviluppo del sistema immunitario, a differenziarsi in cellula T_{REG} (7). Infatti, FoxP3 è essenziale per stabilizzare ed amplificare le caratteristiche funzionali di tale popolazione cellulare permettendo il mantenimento dell'anergia agli stimoli recettoriali e la ridotta produzione di IL-2 a seguito della loro interazione con le cellule stromali timiche (7, 8).

Al momento attuale si conoscono due principali sottopopolazioni di cellule T_{REG} , le sopra citate T_{REG} generate nel timo nelle prime fasi della vita mediante ben precise interazioni con le cellule stromali residenti (T_{REG} naturali), e quelle prodotte in periferia durante tutta la durata della vita dalla conversione di cellule T naïve $CD4^+CD25^-$ in presenza di un particolare microambiente citochinico e di un'appropriate stimolazione antigenica, note come T_{REG} adattative o indotte (9).

Per quanto concerne la loro funzione, le T_{REG} sono in grado di svolgere azione soppressiva verso quei linfociti autoreattivi che sono riusciti ad eludere meccanismi protettivi quali la selezione timica negativa prevenendo, pertanto, la loro attivazione ed

espansione. Tale attività soppressiva viene prevalentemente svolta mediante contatto cellula-cellula, ma è anche possibile che sia mediata da fattori solubili, quali IL-10 e TGF- β , prodotti dalle stesse T_{REG} (10).

Negli ultimi anni, studi condotti su modelli murini di patologie infiammatorie croniche hanno evidenziato un possibile ruolo di tali cellule nella patogenesi delle malattie autoimmunitarie (11-14). Successivamente gli studi si sono quindi focalizzati sull'analisi di un eventuale coinvolgimento delle T_{REG} nella controparte umana di tali patologie, onde chiarire una eventuale alterazione fenotipica e/o funzionale di queste cellule durante la storia naturale della malattia. I risultati di studi condotti in questa direzione nell'artrite reumatoide (AR), prototipo di malattia infiammatoria cronica, sono piuttosto contrastanti.

Non vi è infatti univocità nella quantificazione delle T_{REG} nel sangue periferico di pazienti affetti da AR. Tuttavia, per quanto concerne la determinazione di tale popolazione cellulare a livello del liquido sinoviale degli stessi pazienti, vi è accordo generale nell'affermare che esse siano espanse (15-21). Tale dato, apparentemente paradossale visto il ruolo protettivo svolto dalle T_{REG} sulla risposta autoimmunitaria, troverebbe un parziale spiegazione nella correlazione trovata tra il loro valore percentuale e la durata di malattia. In altri termini, è stata riscontrata una globale riduzione delle T_{REG} nei pazienti con AR all'esordio e naïve per terapia sistemica, mentre si è osservato al contrario un loro progressivo incremento in rapporto alla durata di malattia (22-24).

Tale risultato ha portato ad ipotizzare che se all'esordio della malattia la deplezione di tale popolazione potrebbe essere un fattore favorente lo sviluppo del quadro clinico, nella fase di cronicizzazione della patologia si creerebbe una sorta di meccanismo di compenso per cui verrebbero reclutate cellule T_{REG} dal sangue periferico negli organi bersaglio della malattia, quali la sinovia reumatoide, per contrastare la risposta effettrice T cellulare. Tuttavia, il microambiente proinfiammatorio sarebbe in grado di determinare una inattivazione delle cellule T_{REG} accumulate in tale sede. Ciò favorirebbe quindi un incremento numerico di tali cellule, benchè scarsamente funzionanti, nell'articolazione infiammata.

Per quanto riguarda, invece, gli studi condotti nel lupus eritematoso sistemico (LES), prototipo di malattia autoimmunitaria sistemica, è stato evidenziato che, indipendentemente dalla fase della

malattia, tali cellule si presentano numericamente ridotte in percentuale nel sangue periferico e comunque, qualora il loro numero rimanga nella norma, esse presentano in genere un'alterata funzionalità in relazione al *milieu* proinfiammatorio (25-30). È stata segnalata inoltre una possibile resistenza delle cellule T effettrici alla soppressione T_{REG} -mediata, come evidenziato da studi funzionali condotti in vitro che hanno evidenziato una normale attività soppressiva di cellule Treg ottenute da pazienti affetti da LES verso cellule effettrici di controlli sani (31).

Alla luce di quanto espresso, appare evidente che i dati inerenti la caratterizzazione fenotipica e funzionale di tale popolazione cellulare in corso di patologie autoimmuni sistemiche sono al momento contrastanti e non sempre univoci. Lo scopo del nostro studio è stato pertanto quello di effettuare un'analisi quantitativa ed una caratterizzazione fenotipica delle diverse sottopopolazioni T cellulari in pazienti affetti da LES e la valutazione di un possibile ruolo di GITR come *marker* di cellule T_{REG} umane.

MATERIALI E METODI

Sono stati consecutivamente arruolati 19 pazienti affetti da LES (F=15 M=4; età media $46,7 \pm 12,5$ anni; durata media di malattia $8,5 \pm 6,43$ anni) afferenti alla Struttura di Reumatologia dell'Università di Perugia e 15 soggetti sani di controllo (F=12 M=3; età media $44,2 \pm 11,5$ anni) (32).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione clinica ed a prelievo ematico. L'attività di malattia è stata calcolata al momento della visita mediante il Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) (33).

Al momento dell'arruolamento veniva registrata la terapia di fondo assunta nei 3 mesi precedenti. Tutti i pazienti assumevano idrossiclorochina 200 mg/die; di questi, 15 la assumevano in monoterapia e 4 in associazione ad un farmaco immunosoppressore (1 paziente in terapia con azatioprina 100 mg/die e 3 con micofenolato mofetile 2 g/die). Il campione di sangue in provetta eparinata è stato separato secondo gradiente con Hystopaque 1077 (SIGMA) a 1800 rpm a temperatura ambiente per 30 minuti.

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) così ottenute sono state sottoposte a separazione magnetica (selezione negativa) per ottenere la popolazione $T CD4^+$ ($CD4$ human isolation

kit II e colonne LD, Miltenyi Biotech). Brevemente, le cellule T non- $CD4^+$ es. cellule T $CD8^+$, cellule T $\gamma\delta$, granulociti, cellule B, cellule NK, monociti, cellule dendritiche e cellule eritroidi sono state rimosse dopo incubazione con un cocktail di anticorpi coniugati con biotina rivolti verso $CD8$, $CD14$, $CD16$, $CD19$, $CD36$, $CD56$, $CD123$, TCR $\gamma\delta$ e Glycophorin A. Quindi, è stata realizzata una separazione mediante microbeads anti-biotina con colonne *large depletion* (LD) (Miltenyi Biotech). Le cellule T $CD4^+$ risultanti hanno mostrato in citofluorimetria una purezza $>98\%$.

Per la caratterizzazione fenotipica in citofluorimetria, la colorazione delle cellule $CD4^+$ così ottenute è stata realizzata con anti-GITR-PE (Biolegend), anti- $CD25$ biotinilato (Miltenyi biotech) ed i rispettivi isotipi.

L'analisi è stata effettuata con citofluorimetro Beckman Coulter EPICS XL-MCL ed EXPO32 ADC software.

Per l'estrazione dell'RNA e la successiva real time PCR le cellule T $CD4^+$ isolate da 4 pazienti con LES e da 4 volontari sani, sono state marcate con anti- $CD25$ biotinilato e con anti-GITR PE e sottoposte ad ulteriori passaggi. Per separare la componente T $CD25^+$, le cellule sono state trattate con microbeads anti-biotina e fatte passare in colonna *medium selection* (MS), quindi con microbeads anti-PE e ulteriormente in colonna MS. L'RNA è stato estratto dalle popolazioni cellulari così ottenute mediante RNeasy Plus Micro kit (Qiagen), retroscritto con Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen), e la real time PCR è stata realizzata mediante Chromo 4 Four-Color Real-Time System (Bio-Rad formerly MJ Research).

L'analisi statistica dei dati acquisiti è stata realizzata mediante il t-test di Student o calcolando il coefficiente di correlazione di Spearman secondo indicazione considerando significativi valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

Nei pazienti affetti da LES si è evidenziata una riduzione percentuale statisticamente significativa delle cellule T $CD25^{high}GITR^{high}$ rispetto ai controlli ($0,37 \pm 0,21\%$ vs $0,72 \pm 0,19\%$ $p < 0,05$). Un dato interessante è stato la dimostrazione di un'espansione della sottopopolazione $CD25^+GITR^{high}$ nel sangue periferico dei pazienti con LES rispetto ai controlli ($3,5 \pm 2,25$ vs $0,70 \pm 0,32\%$, $p < 0,01$) (Fig. 1). Allo scopo di meglio caratterizzare tale espan-

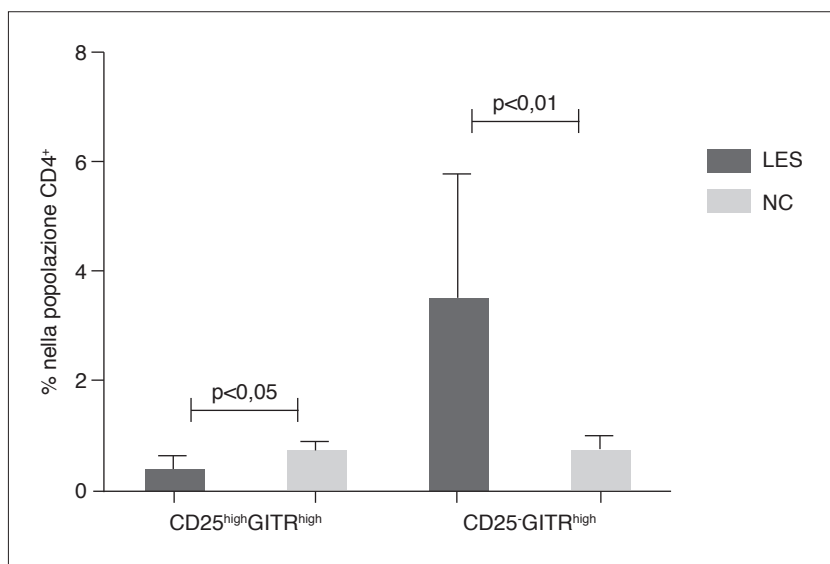


Figura 1 - Espressione percentuale delle sottopopolazioni CD4⁺CD25^{high}GITR^{high} e CD4⁺CD25-GITR^{high} nei pazienti affetti da LES e nei controlli sani.

sione della sottopopolazione cellulare CD25-GITR^{high} nei pazienti con LES, si è proceduto, a scopo esemplificativo, alla valutazione dell'espressione dell'mRNA di FoxP3 in tali cellule in alcuni pazienti fuori da trattamenti immunosoppressivi ed in alcuni soggetti sani.

Come controllo positivo e negativo sono state utilizzate rispettivamente la popolazione CD25^{high}GITR^{high}, notoriamente regolatoria, e CD25-GITR⁻, notoriamente effettrice e che dunque non esprime FoxP3. Rispetto alla sottopopolazione cellulare effettrice CD25-GITR⁻, nei soggetti sani è stato riscontrato un incremento dell'mRNA di FoxP3 sia

nella popolazione CD25-GITR^{high} che in quella CD25^{high}GITR^{high}. Quest'ultima mostrava, come atteso, i livelli più elevati di mRNA (Fig. 2). Nei pazienti, per quanto l'espressione di FoxP3 nella popolazione cellulare CD25-GITR^{high} e CD25^{high}GITR^{high} sia risultata incrementata rispetto alla sottopopolazione CD25-GITR⁻ effettrice di controllo, vi erano alcune differenze rispetto alla controparte del soggetto sano.

Nei pazienti, l'espressione di FoxP3 nel subset CD25^{high}GITR^{high}, pur essendo incrementata rispetto al *subset* cellulare effettrice, era statisticamente minore rispetto ai controlli sani (Fig. 2). Per

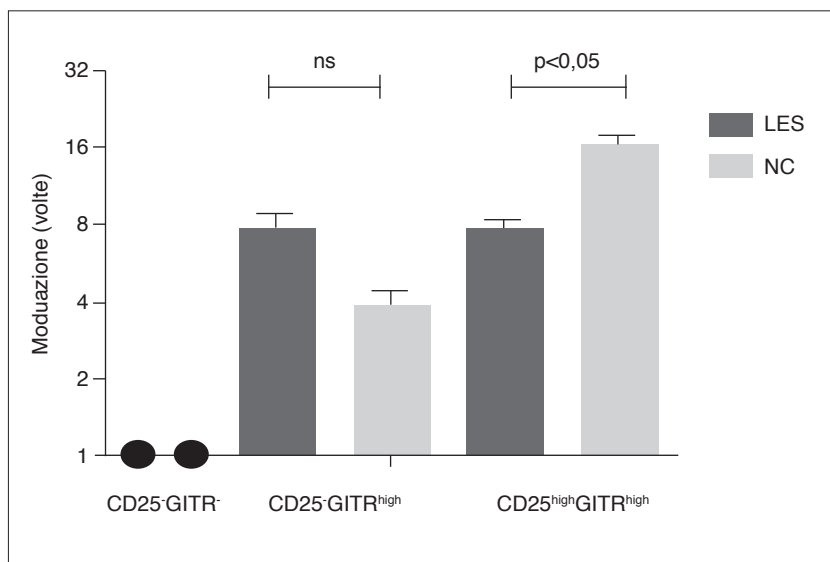


Figura 2 - Espressione di FoxP3 nelle sottopopolazioni CD4⁺CD25^{high}GITR^{high} e CD4⁺CD25-GITR^{high} in confronto alla popolazione effettrice di controllo CD4⁺CD25-GITR⁻ in 4 pazienti affetti da LES e 4 controlli sani.

contro, nella sottopopolazione CD25⁻GITR^{high} l'espressione di FoxP3 era superiore nei pazienti rispetto ai controlli, anche se in maniera non significativa. Per quanto concerne, infine, le correlazioni clinico-laboratoristiche, valutate mediante il calcolo del coefficiente di correlazione di Spearman, non sono state riscontrate significative tra i valori percentuali dei due *subsets* cellulari d'interesse e parametri clinici e bioumorali dei pazienti lupici, quali attività di malattia (SLEDAI), VES, PCR, durata di malattia, terapia in atto e specificità anti-ENA.

DISCUSSIONE

Il presente studio ha dimostrato che i pazienti affetti da LES presentano una riduzione percentuale delle cellule CD4⁺CD25^{high}GITR^{high} rispetto a soggetti sani di controllo e che queste cellule presentano alti livelli di FoxP3, come era prevedibile aspettarsi trattandosi di cellule ad alta espressione di CD25. È da sottolineare che GITR appare essere un marker delle cellule T_{REG} co-espresso con il CD25, come dimostrato nel modello murino ed in uno studio sull'uomo (37-39). In tal senso, quindi, il dato risultante in questo studio è in accordo con precedenti dimostrazioni di una riduzione delle cellule T_{REG} CD4⁺CD25^{high} nel sangue periferico di pazienti affetti da LES (9-12).

D'altro canto, il dato interessante emerso dal nostro studio è stato il riscontro dell'espansione di una nuova popolazione di cellule T che, pur esprimendo bassi livelli di CD25, esprime FoxP3 e la cui caratteristica fenotipica peculiare è l'espressione superficiale di alti livelli di GITR. La funzione specifica delle T_{REG} è quella di assicurare che la tolleranza immunologica al *self* venga mantenuta durante tutta la vita e quindi di prevenire lo sviluppo di autoimmunità eliminando i cloni linfocitari autoreattivi.

Se tali cellule sono numericamente ridotte per ragioni non ancora del tutto chiarite, la controparte T effettrice diventa prevalente, il microambiente proinfiammatorio mantiene il *feed-back* positivo e la risposta autoimmune non viene bloccata. Alla luce dei nostri dati si può ipotizzare che l'espansione della popolazione CD4⁺CD25⁻ possa rappresentare un meccanismo di compenso a tale deplezione e che GITR possa mediarne la funzione soppressiva.

Le evidenze presenti in letteratura riguardo il ruolo di tale molecola nel contesto delle T_{REG} umane so-

no scarse e spesso in disaccordo (15-17), dal momento che così come nella controparte murina, la stimolazione attraverso il ligando specifico può dar origine a molteplici vie di attivazione e quindi a diversi effetti clinici (3, 14). Nel nostro caso, accanto al riscontro di un'espansione della popolazione T cellulare CD4⁺CD25⁻GITR^{high}, un'analisi più approfondita a livello di mRNA ha mostrato una significativa espressione di FoxP3, che orienterebbe quindi verso un fenotipo regolatorio.

L'assenza in questa popolazione cellulare di una correlazione tra l'espressione di CD25 e quella di FoxP3, ed il riscontro viceversa di una sua correlazione con GITR, sembrerebbe conferire a quest'ultimo un ruolo come *marker* di cellule T_{REG} anche nell'uomo.

In particolare, sulla base di tali osservazioni, l'elevata espressione di CD25 potrebbe non essere più condizione così necessaria per la definizione di fenotipo regolatorio in generale, ma piuttosto sarebbe caratteristica di una delle tante sottopopolazioni di T_{REG} funzionalmente simili, ma fenotipicamente diverse.

In questo contesto, FoxP3 notoriamente il *marker* più specifico di attività regolatoria, potrebbe essere l'elemento comune a tutti i diversi *subsets* di cellule Treg conferendo loro l'attività funzionale che le contraddistingue.

Il motivo dell'espansione del subset T regolatorio CD4⁺CD25⁻GITR^{high} nei pazienti lupici rispetto ai controlli, potrebbe verosimilmente corroborare l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo di compenso legato alla contestuale riduzione delle T_{REG} naturali CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ e volto a contrastare la risposta autoimmune e di conseguenza l'evoluzione della malattia (34).

Sono al momento in corso studi per una più dettagliata analisi fenotipica ed una parallela valutazione funzionale dei diversi *subsets* T cellulari nei pazienti affetti da LES per inquadrare in maniera più approfondita le popolazioni d'interesse.

In conclusione, nonostante i promettenti dati sperimentali già acquisiti nel modello murino, la complessità della patologia autoimmune nell'uomo non consente al momento una caratterizzazione definitiva del ruolo delle T_{REG} nella patogenesi di tali condizioni e necessita quindi di ulteriori verifiche. Questo non solo per acquisire elementi aggiuntivi nella conoscenza della patogenesi delle malattie autoimmuni, ma anche per una potenziale applicazione terapeutica di tali cellule, come emerge peraltro da recenti studi di estremo interesse pubblicati in letteratura (35, 36).

RIASSUNTO

La caratterizzazione dei subset di T_{REG} in pazienti affetti da malattie autoimmunitarie, è un punto cruciale per la comprensione dei meccanismi responsabili dello sviluppo della patologia. Dalla valutazione di 19 pazienti con LES è stata riscontrata una riduzione della popolazione delle cellule CD4⁺CD25^{high}GITR^{high} rispetto a 15 NC. Contestualmente abbiamo evidenziato un'espansione di un nuovo *subset* regolatorio CD4⁺CD25⁻GITR^{high} che esprime FoxP3 pur in assenza di CD25. È pertanto ipotizzabile che la presenza di GITR ad alti livelli sia una caratteristica fenotipica che permette di definirlo come *marker* specifico di T_{REG} umane così come è già stato dimostrato in modelli murini.

Parole chiave - Cellule T regolatorie, GITR, lupus eritematoso sistemico, FoxP3.

Key words - *Regulatory T cells, GITR, systemic lupus erythematosus, FoxP3.*

BIBLIOGRAFIA

- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α chain (CD25), breakdown of a single mechanism of self tolerance causes various autoimmune disease. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1303-10.
- Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, et al. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6216-21.
- Klein S, Kretz CC, Krammer PH, Kuhn A. CD127(low/-) and FoxP3⁺ expression levels characterize different regulatory T cell populations in human peripheral blood *J Invest Dermatol* 2010; 130: 492-9.
- Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000; 106: 75-81.
- Gambineri E, Torgerson TR, Ochs TD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FoxP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Op Rheumatol* 2003; 15: 430-5.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. FoxP3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-6.
- Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. FoxP3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 2009; 10: 689-95.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naïve T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor FoxP3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875-86.
- Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact independent type 1 like regulatory cells. *J Exp Med* 2002; 196: 247-53.
- Kelchtermans H, De Klerck B, Mitera T, Van Balen M, Bullens D, Billiau A, et al. Defective CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell functioning in collagen induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN- γ . *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R402-15.
- Morgan ME, Suttmuller RPM, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJM, et al. CD25 cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1452-60.
- Morgan ME, Flierman R, van Duivenvoorde LM, Witteveen HJ, van Ewijk W, van Laar JM, et al. Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25 regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2212-21.
- Cuzzocrea S, Ayroldi E, Di Paola R, Agostini M, Mazon E, Bruscoli S, et al. Role of glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) in collagen-induced arthritis. *FASEB J* 2005; 19: 1253-65.
- Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003; 33: 215-23.
- Van Amelsfort JMR, Jacobs KMG, Johannes WJ, Lafeber F, Taams LS. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis. Differences in the presence, phenotype and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2275-85.
- Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4⁺CD25⁺ T cells with phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 360-7.
- Liu MF, Wang CR, Fung LL, Lin LH, Tsai CN. The presence of cytokine-suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2005; 62: 312-7.
- Han GM, O'Neil Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4⁺CD25^{high} T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 2008; 253: 92-101.

20. Jiao Z, Wang W, Li J, You H, Chen L, Wang Y. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007; 36: 428-33.
21. Lin SC, Chen KH, Lin CH, Kuo CC, Ling QD, Chan CH. The quantitative analysis of peripheral blood FoxP3-expressing T cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 987-96.
22. Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, Douglas SH, Burgoyne CH, Greenstein AS et al. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25 high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology* 2006; 45: 1210-7.
23. Behrens F, Himsel A, Rehart S, Stanczyk J, Beutel B, Zimmerman SY, et al. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2007; 66: 1151-6.
24. van Amelsfort JMR, van Roon JAG, Noordegraaf M, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, et al. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 732-42.
25. Zhang B, Zhang X, Tang FL, Zhu LP, Liu Y, Lipsky PE. Clinical significance of increased CD4+CD25-FoxP3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1037-40.
26. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2005; 175: 392-400.
27. Valencia X, Yarboro C, Illei G, Lipsky PE. Deficient CD4+CD25high regulatory T cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 2007; 178: 2579-88.
28. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, Tutor-Ureta P, Yebra-Bango M, Andrei JL, et al. Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 553-4.
29. Barath S, Aleksza M, Tarr T, Sipka S, Szegedi G, Kiss E. Measurement of natural (CD4+CD25high) and inducible (CD4+IL-10+) regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2007; 16: 489-96.
30. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2003; 21: 273-6.
31. Chowdary Venigalla RM, Tretter T, Krienke S, Max R, Eckstein V, Blank N, et al. Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+CD25highCD127low regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2120-30.
32. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
33. Bombardieri C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang DH, and the Committee on Prognosis Studies in SLE. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 630-40.
34. Bonelli M, Smolen JS, Scheinecker C. Treg and lupus. *Ann Rheum Dis* 2010; 69 Suppl1: i65-66.
35. Verbsky JV. Therapeutic use of T-regulatory cells. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19: 252-8.
36. Esensten JH, Wofsy G, Bluestone J. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 560-5.
37. Alunno A, Bartoloni Bocci E, Nocentini G, Bistoni O, Ronchetti S, Petrillo MG, et al. Role of regulatory T cells in rheumatoid arthritis: fact and hypothesis. 2010; 1: 45-51.
38. Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C. GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol* 2007. 37: 1165-9.
39. Lau KM, Cheng SH, Lo KV, Lee SA, Woo JK, van Hasselt CA et al. Increase in circulating FoxP3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 617-22.