

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BIOLOGIE



ANNA URBANOVÁ

ÚLOHA T REGULAČNÍCH BUNĚK U TRANSPLANTACÍ LEDVIN

THE ROLE OF T REGULATORY CELLS IN KIDNEY TRANSPLANTATION

Bakalářská práce

Školitel: Prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

Praha 2011

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc. za odborné konzultace a věnovaný čas.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Obsah

1	Abstrakt.....	2
2	Abstract.....	3
3	Seznam použitých zkratk 4	4
4	Úvod.....	5
5	Cíl práce	5
6	Druhy Th buněk	6
7	Charakteristika T regulačních buněk.....	8
8	Specifické markery T regulačních buněk	9
9	Vývoj a rozdělení T regulačních buněk	11
10	Mechanismy působení T regulačních buněk.....	14
10.1	Suprese pomocí inhibičních cytokinů.....	14
10.2	Suprese cytolýzou.....	14
10.3	Ovlivnění metabolismu efektorových T buněk	15
10.4	Modulace zrání a funkce dendritických buněk.....	16
11	Buněčné mechanismy rejekce štěpu	17
11.1	Typy rejekcí ledvinového štěpu	18
12	Uplatnění T regulačních buněk v rámci transplantace ledvin.....	20
13	Rozdělení imunosupresivních léčiv	22
13.1	Vliv imunosupresiv na T regulační buňky	23
14	Závěr.....	25
15	Použitá literatura.....	26

1 ABSTRAKT

T regulační lymfocyty (Treg) patří do skupiny $CD4^+$ buněk. Jsou podstatnou součástí imunitního systému. Treg buňky zabraňují nadměrné aktivaci efektorových T buněk a udržují toleranci vůči tělu vlastním tkáním. Jsou charakterizovány vysokou expresí CD25 a transkripčního faktoru Foxp3. Rozlišují se dvě základní populace Treg buněk: přirozené Treg buňky (nTreg), které vznikají v thymu a představují 5-10 % všech $CD4^+$ buněk, a indukované Treg buňky (iTreg), vytvořené z naivních $CD4^+$ buněk v periférii.

Jejich regulační efekt je dobře znám, proto by využití Treg buněk mohlo přinést obrovský léčebný potenciál pro pacienty s transplantovanou ledvinou. Zdraví lidé a pacienti tolerantní vůči transplantované ledvině vykazují větší zastoupení cirkulujících a ve štěpu přítomných Treg buněk, narozdíl od pacientů s chronickou rejekcí. Tolerance je zrušena poškozením $CD4^+CD25^+$ buněk.

Pro uchycení štěpu je nutné podávat pacientovi po transplantaci imunosupresivní látky, které mají za následek potlačení imunitní reakce proti štěpu. Jejich nevýhodou jsou vedlejší efekty, které mají paradoxně mnohdy za následek i smrt pacienta. Navíc mají často negativní vliv na přežívání a expanzi Treg buněk. Je velmi žádoucí najít u pacienta po transplantaci jednoznačný příznak toho, že u konkrétního pacienta lze přerušit imunosupresivní léčbu. Nejvíce informativní známkou predikce výskytu akutní rejekce u pacientů po transplantaci a následném přerušení léčby takrolimem byl analýzou průtokové cytometrie zjištěn poměr paměťových T buněk a Treg buněk hodnocených těsně před přerušením léčby takrolimem a změny v distribuci naivních, efektorových a paměťových buněk v průběhu času.

Klíčová slova:

Treg, transplantace ledvin, mechanismus, imunosupresivní léčba

2 ABSTRACT

T regulatory lymphocytes (Treg) belong to the CD4⁺ cell group. They are an essential part of the immunity system. Treg cells prevent from excessive activation of effector T cells and they keep the tolerance to the tissues of the body. They have high expression of CD25 and the transcription factor Foxp3. We distinguish two basic populations of Treg cells: natural Treg cells (nTreg) created in the thym and representing 5-10 % of all CD4⁺ cells, and induced Treg cells (iTreg), created from naive CD4⁺ cells in the periphery.

Their regulatory effect is well-known, therefore using of Treg cells could bring about a huge treatment potential for patients with a transplanted kidney. Healthy people and patients tolerant to the transplanted kidney show higher occurrence of circulating Treg cells and the Treg cells present in the graft unlike patients with chronic rejection. The tolerance is cancelled with the damage of CD4⁺ CD25⁺ cells.

For a graft acceptance it is necessary to treat the patient after the transplantation with immunosuppressive medicaments resulting in suppression of immunity reaction against the graft. Their disadvantages are side effects often resulting in the patient's death. Moreover they often have a negative impact on survival and expansion of Treg cells. The analysis of flow cytometry has shown that the most informative marks regarding the prediction of occurrence of acute rejection with transplantation patients are the ratio of memory T cells and Treg cells evaluated immediately before the treatment interruption with tacrolimus and the change of the distribution of naive, effector and memory cells during the time.

Key words:

Treg, kidney transplantation, mechanism, immunosuppressive treatment

3 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APAF1	apoptotic protease activating factor 1
APC	antigen presenting cell
aTreg	adaptive regulatory T cell
cAMP	cyclic adenosin monophosphate
CD4	koreceptor TCR, váže se na MHC gp II. třídy
CD8	koreceptor TCR, váže se na MHC gp I. třídy
CD80/86	kostimulační molekuly patřící do rodiny proteinů B7
CD25	α podjednotka IL-2 receptoru
CD127	α podjednotka IL-7 receptoru
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
DC	dendritic cell
DR5	death receptor 5
Foxp3	forkhead box protein 3
GATA3	GATA binding protein 3
GITR	glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor
GVHD	graft versus host disease
HLA	human leukocyte antigen
IFN	interferon
IL	interleukin
IPEX syndrome	immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked
iTreg	induced regulatory T cell
Ig	imunoglobulin
LAG	lymfocyte activation gene-3
LAP	latency-associated peptide
mAb	monoclonal antibody
MHC gp	major histocompatibility complex glycoprotein
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	natural killer
nTreg	natural Treg
RORyt	orphan nuclear receptor
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCR	T cell receptor
TGF- β	transforming growth factor β
Tef	efector T cell
Th	helper T cell
TNF	tumor necrosis facor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ T cell
Tr1	Type 1 regulatory T cell

4 ÚVOD

Imunitní systém je důležitý z hlediska obrany organismu proti škodlivinám zevního i vnitřního původu, udržení homeostáze a integrity organismu. Skládá se z bílých krvinek, které spolu vzájemně komunikují, a výsledkem je příslušná buněčná odpověď. Úkolem imunitního systému je tedy rozeznání patogenů, starých, poškozených nebo zmutovaných buněk a jejich odstranění. Dále musí být imunitní systém schopen rozeznat tělu vlastní tkáň a nepoškozovat je. Ke správnému fungování imunitního systému musí být přítomné regulační mechanismy, které regulují působení efektorových buněk v rámci imunitní odpovědi a tím zabraňují patologickým stavům a dále různým autoimunitním chorobám.

Kromě mechanismů bránících patologickým zánětlivým reakcím bylo u myši zjištěno, že jedním z regulačních mechanismů je populace T regulačních lymfocytů (Treg) exprimující transkripční faktor Foxp3 a vyznačující se vysokou expresí CD25 (Sakaguchi et al. 1995). Posléze v roce 2001 byly na základě těchto informací lidské Treg buňky charakterizovány jako $CD4^+CD25^+$ Foxp3⁺ T buňky (Baecher-Allan et al. 2001).

Treg buňky by mohly hrát zásadní roli v léčbě rakoviny a při transplantacích. Transplantace ledvin je často jediné řešení u pacientů s posledním stádiem selhání ledvin a vyžaduje dlouhodobé podávání imunosupresivních látek. Imunosupresivní léčba má řadu nevýhod např. náchylnost pacienta k infekcím, či vznik různých malignit. Bez této léčby by ale brzy došlo k rejekci a ztrátě štěpu.

Cílem lékařů je najít takový způsob léčby, při kterém by nebylo nutné podávat pacientovi imunosupresivní látky, čímž by se výrazně zlepšil život pacienta s transplantovanou ledvinou. Jedním ze způsobů by mohlo být využití Treg lymfocytů, které by potlačily imunitní reakci namířenou proti štěpu, a tím by zabránili odhojení štěpu.

Treg buňky tedy představují obrovské možnosti pro léčebné využití například v léčbě rakoviny a při transplantacích, kde není bez použití imunosupresivní léčby možné uchycení štěpu. Proto je nutné více studií, aby se o nich vědělo co nejvíce informací.

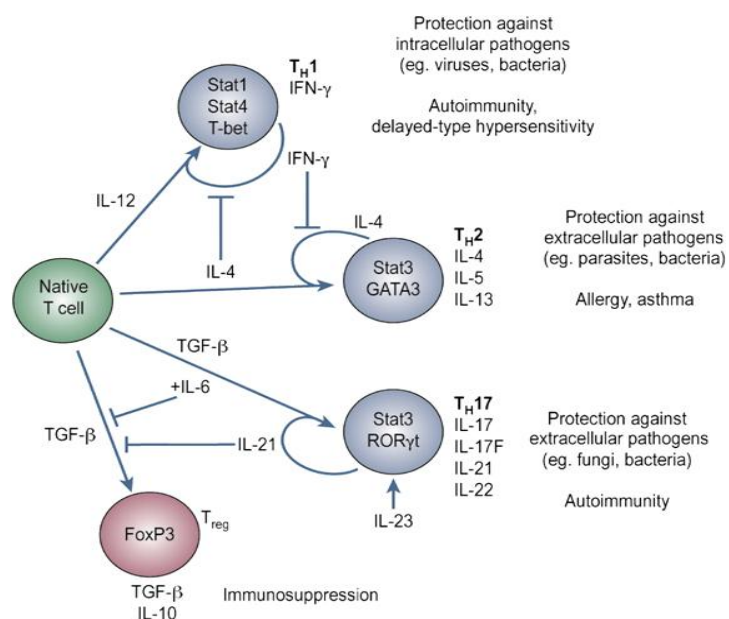
5 CÍL PRÁCE

Cílem této práce na téma Úloha T regulačních buněk u transplantací ledvin je shrnout známé poznatky a mechanismy působení regulačních lymfocytů a představit výsledky různých studií z pohledu jejich využití v rámci transplantací ledvin.

6 DRUHY Th BUNĚK

Z thymu odcházejí 2 subpopulace fenotypicky a funkčně odlišných buněk: prekurzory pomocných buněk (Th) a prekurzory cytotoxických buněk (CTL). Th buňky nesou CD4 koreceptor a jsou to buňky pomocné. Jsou schopny rozeznávat specifické antigeny asociovány s MHC gp. II. třídy. CTL mají CD8 koreceptor a jejich funkcí je převážně cytotoxicky zabíjet ostatní buňky. CD8⁺ buňky rozeznávají antigeny v asociaci s MHC gp. I. třídy.

CD4⁺ buňky se tradičně rozdělují na Th1 a Th2 buňky. Th1 hrají roli v obraně proti intracelulárním patogenům, zatímco Th2 proti extracelulárním patogenům. Funkce Th1 a Th2 buněk závisí na schopnosti produkovat různé cytokiny jako IFN- γ a IL-2 v případě Th1 buněk a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13 v případě Th2 buněk. IL-12 indukuje generování Th1 buněk aktivací signalizační dráhy STAT4 a následnou indukci hlavního transkripčního faktoru T-bet. Výsledkem je produkce IFN- γ , který aktivuje makrofágy. Indukce Th2 buněk je zahájena aktivací STAT6 závislou na IL-4, který aktivuje expresi transkripčního faktoru GATA3, jež umožňuje naivním CD4⁺ buňkám produkovat IL-4, IL-5 a IL-13. Th1 buňky mohou mít za následek rozvinutí chorob jako je artritida nebo roztroušená skleróza, zatímco alergie, atopie a astma jsou spojovány s Th2 buňkami. Dalšími typy buněk jsou regulační T lymfocyty a Th17 buňky. Hlavní cytokin, který je produkován nedávno objevenými Th17 buňkami, IL-17, je považován za spouštěče zánětové reakce. Aby se imunitní odpověď nezvrhla v patogenní reakci, je třeba neustálé regulování imunitního systému. Těmito regulacemi jsou, mimo jiné mechanismy, Treg buňky exprimující transkripční faktor Foxp3 (Deenick and Tangye 2007). Nejmladší objevená subpopulace CD4⁺ buněk jsou Th9 buňky, které produkují pouze prozáněťový IL-9 (Perumal and Kaplan 2011).



Obrázek 1. Diferenciace CD4⁺ buněk. Naivní CD4⁺ buňka se v přítomnosti IL-12 vyvine v Th1 buňku přes signální dráhu Stat4. Tato buňka produkuje IFN- γ , který aktivuje makrofágy a inhibuje vývoj směrem k Th2 buňkám. Th2 vznikne aktivací Stat3 a následnou Stat6 spuštěnou IL-4 a posléze produkcí IL-4, IL-5 a IL-13, které inhibují vývoj Th1 buněk. Th17 potřebuje pro svůj vývoj TGF- β spolu s IL-6. Tyto cytokiny indukují přes signální dráhu Stat3 expresi transkripčního faktoru ROR γ t, který zvýší produkci IL-17. Pro udržení populace Th17 buněk je důležitý IL-23. Treg se vyvíjí v přítomnosti samotného TGF- β , který aktivuje expresi transkripčního faktoru Foxp3. Tato exprese indukuje produkci tlumivých cytokinů TGF- β a IL-10. Th1 a Th2 buňky inhibují diferenciaci Th17. (Převzato od Deenick and Tangye 2007).

7 CHARAKTERISTIKA T REGULAČNÍCH BUNĚK

Regulační T lymfocyty potlačují rozvinutí autoimunitních chorob udržováním tolerance vůči tělu vlastním tkáním (Sakaguchi et al. 1995), zabraňují rozvinutí alergií a navozují orální toleranci a toleranci matky k plodu (Corthay 2009). Regulační lymfocyty jsou naprosto nezbytnou součástí imunitního systému a bez nich by se fyziologická odpověď zvrhla v patologickou. Treg buňky inhibují autoreaktivní lymfocyty, které unikly působení centrální tolerance v thymu, a navozují periferní toleranci. Schopnost suprese není ale výhradně jen vlastností Treg buněk, například Th1 buňky potlačují vývoj linie Th2 a naopak. IFN- γ a IL-4 produkované Th1 respektive Th2 buňkami potlačují vývoj Th17 buněk (Corthay 2009).

Pro vývoj Treg buněk je nezbytná exprese Foxp3. Myši se spontánní mutací ve Foxp3 se nazývají Scurfy a tato mutace vede k fatálním lymfoproliferativním selháním – myši umírají ve věku kolem 3-4 týdnů (Brunkow et al. 2001). Podobně u lidí vede tato mutace k multiorgánovému selhání a projevuje se rozvinutím syndromu IPEX (Wildin et al. 2001).

Treg buňky nemají ale pouze pozitivní dopad na tělo. Ukázalo se, že pacienti se zhoubným nádorem a pacienti, co trpí jeho navrácením, mají v krvi větší počet Treg buněk než zdraví pacienti. Rakovinné buňky jsou pro imunitní systém špatně rozpoznatelné a Treg buňky brání jejich odstranění, čímž přispívají k rozvoji nádoru. Rakovinné buňky indukují vytváření Treg buněk přímým kontaktem nebo skrze proteiny. Produkce TGF- β podporuje proliferaci Treg buněk a indukuje konverzi naivních CD4⁺CD25⁻ buněk na Treg buňky. Ty pak inhibují NK buňky, CD4⁺CD8⁺ buňky a další a přispívají k rozvoji nádoru. Podle studie od Shimizu et al. poškození Treg buněk pomocí CD25 specifických monoklonálních protilátek podporuje rejekci několika transplantovaných nádorových buněčných linií, a tedy pravděpodobně Treg buňky inhibují imunitní odpověď proti nádoru zprostředkovanou T buňkami (Shimizu et al. 1999). Proto kromě tradiční terapie zahrnující chemoterapii a radioterapii se uvažuje o nové terapii k léčbě rakoviny, která by byla cílená na odstranění Treg buněk, či potlačení jejich funkce.

8 SPECIFICKÉ MARKERY T REGULAČNÍCH BUNĚK

Pro možnost využití Treg buněk je důležité umět tyto buňky rozpoznat od ostatních buněk. Proto bylo nezbytné nalézt specifické povrchové značky, které by je jednoznačně charakterizovaly. Treg jsou $CD4^+$, což je koreceptor TCR. Jako u všech $CD4^+$ buněk dochází k přeskupení genů pro TCR, což umožňuje rozeznání různých antigenních peptidů v kontextu s MHC molekulami II. třídy. MHC gp. II. třídy jsou na APC a jejich funkce je vázat peptidové fragmenty proteinů pohlcených nebo produkováných buňkou a prezentovat je T lymfocytům. Po setkání se specifickým ligandem dojde k extravazaci aktivovaných Treg buněk do zanícených tkání.

K hlavním povrchovým molekulám patří CD25. Ukázalo se, že IL-2 je nezbytný pro generování Treg buněk v thymu a pro jejich přežívání, expanzi a funkci v periférii (Malek and Bayer 2004). Neutralizace pomocí IL-2 protilátek in vivo vede u myši k autoimunitním chorobám (Setoguchi et al. 2005). Protože je ale IL-2 růstovým faktorem pro všechny T buňky a je důležitý pro klonální expanzi buněk, všechny T buňky exprimují při aktivaci CD25.

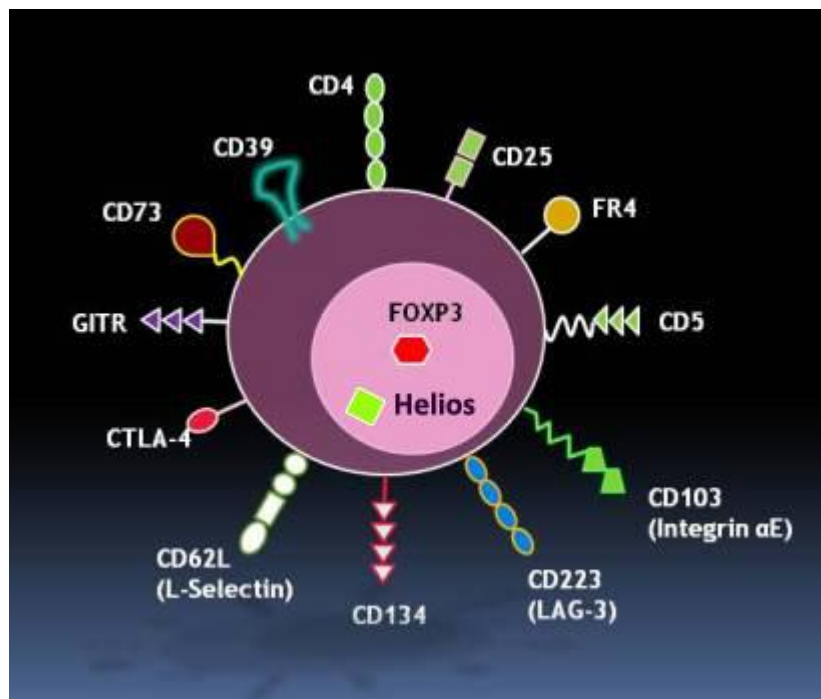
Dalšími molekulami jsou CTLA-4 a GITR. CTLA-4 je negativní regulátor aktivace T buněk, který je exprimován na všech $CD4^+$ a $CD8^+$ buňkách 2-3 dny po aktivaci. Použití anti-CTLA-4 mAb blokuje supresorovou aktivitu Treg buněk in vivo i in vitro (Read et al. 2000). Podobně exprese GITR a LAG-3 nacházející se na Treg buňkách je indukovaná v T buňkách při aktivaci.

Studie z poslední doby také ukazují, že by nízká exprese CD127 mohla být považována za specifický marker Treg buněk. CD127 je α řetězec receptoru pro IL-7. IL-2 je hlavní růstový faktor pro přežití, proto je vysoká míra exprese CD25 u Treg buněk, zatímco IL-7 přispívá k homeostáze Treg buněk jen mírně. Pro tradiční T buňky je ale IL-7 rozhodujícím a jsou $CD127^{high}$ (Corthay 2009).

Pro správnou funkci Treg buněk u myši je nezbytný transkripční faktor Foxp3, protože jeho mutace vede k letálním poruchám. U lidí dochází k expresi dvou hlavních izoform Foxp3: A (Foxp3A) a B (Foxp3B) (Allan et al. 2005). Foxp3A obsahuje N-terminální doménu bohatou na prolin, který může zprostředkovat interakci s NFAT a s NF- κ B. Ve středu se nachází doména leucinový zip a zinkový prst. Leucinový zip je pokládán za důležitý pro dimerizaci. Forhead doména na C terminálním konci je zodpovědná za vazbu k DNA a jadernou lokalizaci (Allan et al. 2005). Nízká exprese Foxp3 navozuje u buněk Treg

fenotyp, ale ne schopnost suprese, zatímco buňky s vysokou expresí Foxp3 jsou suprese schopné (Sakaguchi et al. 2010). Ne všechny Treg buňky ale exprimují Foxp3. Například Foxp3 neexprimují Tr1, což je skupina Treg buněk, která je indukovaná IL-10 a produkuje IL-10. Tef také přechodně exprimují Foxp3, ale nikdy exprese nedosahuje takové úrovně jako u Treg buněk (Allan et al. 2007).

Opravdu spolehlivou značkou by mohl být glykoprotein-A v převládajících repeticích - orphan toll-like receptor složený z repetic bohatých na leucin (GARP), který je pouze exprimován na aktivovaných lidských nTreg buňkách a ne na aktivovaných Tef (Wang et al. 2009). GARP se na aktivovaných nTreg buňkách váže na LAP, což je latentní TGF- β . I když exprese GARP asi není dostačující pro přeměnu LAP na aktivní TGF- β , pravděpodobně může sloužit jako transportér LAPu (Stockis et al. 2009). Pro navádění a zadržení Treg buněk v zánětlivých místech je důležitý $\alpha_E\beta_7$ -integrin (CD103), který rozpoznává epiteliární kadheriny.



Obrázek 2. Povrchové molekuly Treg (převzato z www.biolegend.com).

9 VÝVOJ A ROZDĚLENÍ T REGULAČNÍCH BUNĚK

Treg buňky se tradičně rozdělují na přirozené (nTreg) a indukované (iTreg). Přirozené Treg, kterých je většina, jsou vytvářeny v thymu a tvoří 5 – 10 % z celkového počtu $CD4^+$ buněk v thymu, lymfoidních tkáních a periférii. U neonatálních myší se po odejmutí brzlíku produkce $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ buněk zastavila a došlo k rozvinutí různých autoimunitních chorob (Sakaguchi et al. 2007). U myší bylo prokázáno, že brzlíkové stromální buňky a DC přispívají k rozvoji a diferenciaci Treg buněk (Sakaguchi et al. 2008). Dále pro rozvoj Treg je nezbytná vysokoafinní interakce mezi TCR na Treg buňkách a MHC komplexem prezentovaný na APC. Důležité jsou i kostimulační signály a cytokiny IL-2 a IL-7. Předpokládá se, že tyto požadavky jsou podobné i u lidí. U lidí se navíc ve dřeni brzlíku nachází Hassalova tělíska, která sekretují thymický stromální lymfopoetin (TSLP). TSLP aktivují DC a ty indukují u nezralých $CD4^+CD8^-CD25^-$ thymocytů expresi Foxp3 (Watanabe et al. 2004).

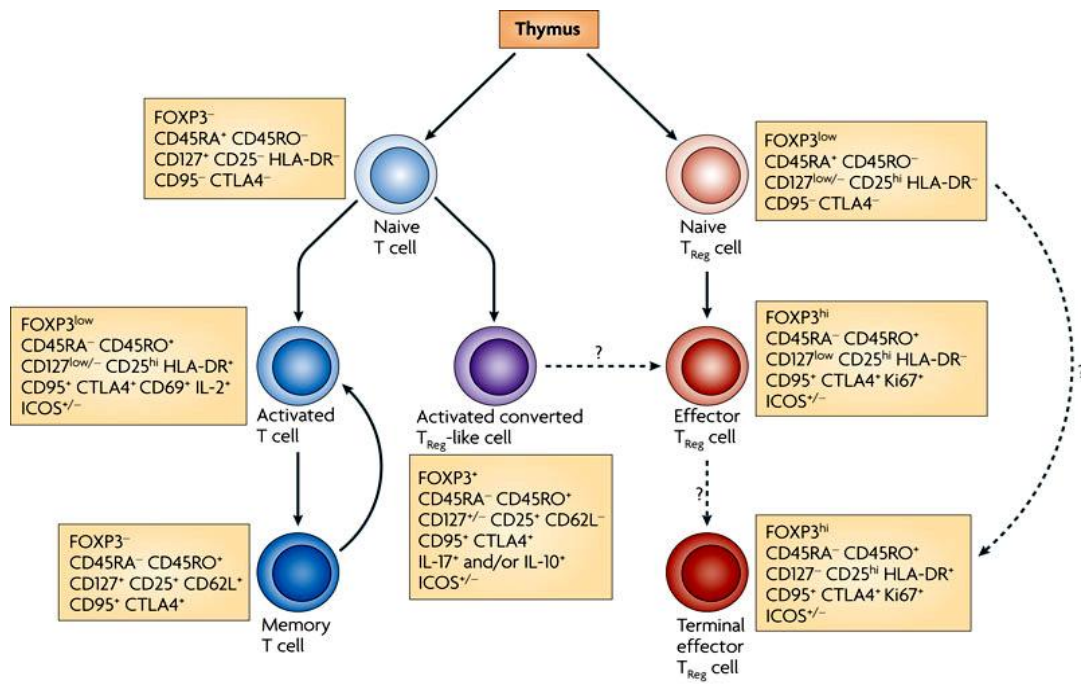
Do roku 2003 nebylo jasné, zda lze z periferních naivních buněk indukovat expresi Foxp3. Ukázalo se, že TGF- β dokáže spolu s doprovodnou stimulací TCR indukovat v naivních periferních $CD4^+CD25^-Foxp3^-$ buňkách Foxp3 expresi a konvertovat je na $CD4^+Foxp3^+$ Treg buňky u myší i u lidí (Chen and Wahl 2003). Tyto buňky se nazývají indukované, nebo také adaptivní. Zdá se, že žádný jiný cytokin nebo solubilní faktor nedokáže nahradit TGF- β v indukcii Treg buněk z naivních $CD4^+$ T buněk. Naskýtá se možnost vytvořit antigen specifické Foxp3 Treg buňky indukované TGF- β , které by měly uplatnění v terapii autoimunitních chorob, v rejekcích a dalších, ačkoli existují rozpory mezi jejich supresorovou funkcí. Do skupiny iTreg patří podskupina Tr1 charakterizovaná produkcí velkého množství IL-10 a podskupina Th3 produkující TGF- β . Ke zvětšení počtu Tr1 v periférii dochází po setkání antigenu a IL-10. Po aktivaci jejich TCR jsou Tr1 schopné suprese naivních a paměťových T buněk. Zatímco nTreg jsou převážně zahrnuty v regulaci odpovědi namířené proti vlastním antigenům, Tr1 kontrolují odpověď na aloantigeny, alergeny a antigeny jídla.

Role APC a makrofágů v konverzi naivních buněk na Treg buňky je následující: v přítomnosti TGF- β jsou dendritické buňky schopné indukovat konverzi Treg buněk, dále TGF- β sekretují. Při pohlcení a strávení apoptotických tělísek makrofágové a DC produkují TGF- β , který podporuje přeměnu naivních $CD4^+$ buněk na $CD4^+Foxp3^+$ Treg buňky (Perruche et al. 2008). Podle studie od Williams et al. mají Th2 buňky blízký vztah s Treg buňkami.

Pokud dojde ke zredukování exprese Foxp3, iTreg buňky se změní na Th2 buňky schopné produkovat cytokiny IL-2 a IL-4 (Williams and Rudensky 2007).

Je možné, že Treg buňky přispívají produkcí TGF- β k diferenciaci Th17 buněk. Navíc jsou schopné se po stimulaci APC diferencovat v Th17 buňky in vitro u myši a lidí (Xu et al. 2007). Zdá se, že lidské CD4⁺Foxp3⁺ T buňky nejsou homogenní v genové expresi, fenotypu a schopnosti suprese. Liší se mírou exprese Foxp3, rozdílem povrchových značek, stupněm DNA metylace genu pro Foxp3, profilem DNA mikroprostředí, TCR repertoárem, proliferací, sekretováním cytokinů a schopností suprese in vitro (Miyara et al. 2009). Podle studie od Miyara et al. se dají lidské Foxp3⁺CD4⁺ T buňky rozdělit do tří fenotypově a funkčně odlišných subpopulací. Populace se schopností suprese in vitro jsou CD45RA⁺Foxp3^{lo} resting Treg (rTreg) a CD45RA⁻Foxp3^{hi} activated Treg (aTreg). Subpopulace CD45RA⁻Foxp3^{lo} sekretuje cytokiny a není suprese schopná. Naivní lidské Treg buňky, u kterých ještě nedošlo ke stimulaci TCR, mají na svém povrchu molekulu CD45RA⁺ a exprimují málo Foxp3. Nepřítomnost proliferačního markeru Ki67 naznačuje, že jsou buňky v klidovém stavu a jsou označovány jako rTreg. Po aktivaci se zvyšuje míra exprese Foxp3 a stávají se z nich CD45RO⁺CD25^{hi}Foxp3^{hi} aTreg (Miyara et al. 2009).

Pro možné klinické využití a manipulaci s Treg buňkami je důležité hodnotit každou subpopulaci Foxp3⁺ T buněk zvlášť, ne jako celou skupinu, a tím zvětšit nebo zmenšit rozmanitost fyziologických a patologických imunitních odpovědí.



Nature Reviews | Immunology .

Obrázek 3. Diferenciace Treg buněk (převzato od Sakaguchi et al. 2010).

10 MECHANISMY PŮSOBENÍ T REGULAČNÍCH BUNĚK

Mechanismy působení Treg buněk na ostatní buňky imunitního systému se dají rozdělit do čtyř základních skupin: sekrece inhibičních cytokinů, suprese cytolyzou, ovlivnění metabolismu Tef a modulace zrání a funkce DC. Výsledky různých studií jsou rozporuplné, proto není stále jasné, který mechanismus je rozhodující, a jakou měrou se každý ze způsobů podílí na supresi zprostředkované Treg buňkami.

10.1 SUPRESE POMOCÍ INHIBIČNÍCH CYTOKINŮ

Tři hlavní inhibiční cytokiny, o kterých se předpokládá, že hrají důležitou roli v efektorové funkci Treg, jsou IL-10, TGF- β a nově objevený IL-35. Výsledky různých studií in vitro a in vivo se liší, proto není jasné, zda jsou, či nejsou inhibiční cytokiny nezbytné pro správnou funkci Treg buněk. Podle jedné studie je IL-10 produkovaný Treg buňkami nezbytný pro zabránění vzniku colitidy u myši (Asseman et al. 1999). Podobně je tomu u nádorového prostředí, které podporuje generování Treg buněk, a ty pak tlumí protinádorovou imunitu skrz IL-10 (Loser et al. 2007). Zdá se, že novou rolí pro IL-10 je udržení tolerance matky k plodu a mnoho dalších případů (Schumacher et al. 2007). Tedy, důležitost IL-10 závisí na organismu či chorobě a na experimentálním systému. Navíc TGF- β je zároveň imunosupresivním i imunostimulačním cytokinem.

10.2 SUPRESE CYTOLÝZOU

Cytotoxická aktivita byla dlouho přisuzována jen NK buňkám a CTL buňkám. Nicméně se při pokusech ukázalo, že i lidské Treg buňky produkují granzym A a perforin (Cao et al. 2007). Cytolýza je proces, který vede k apoptóze. Apoptóza je programovaná buněčná smrt (PCD), která je pro organismus nezbytná například při vývoji organismu nebo v odstraňování starých, poškozených a nadbytečných buněk. Navození apoptózy je buď vnitřní, nebo vnější. Vnější navození je pomocí sekrece perforinu a granzymů. V membráně buňky se nachází cytotoxická granula, která obsahují protein perforin a serinové proteázy zvané granzymy A a B. Poté, co dojde k degranulaci cytotoxické buňky, tedy k rozeznání cílové buňky lymfocylem pomocí CTR a kostimulačních molekul a k uvolnění granul do štěrbin mezi dvěma buňkami, perforin vytvoří v cílové membráně póry a jimi se dostanou do buňky granzymy. Někdy může dojít k smrti osmotickou lýzou a nejsou potřeba granzymy, většinou ale ano. Granzymy pak štěpí prekurzory iniciačních

proteáz ze skupiny kaspáz, u kterých se tak aktivuje proteolytická aktivita a tyto iniciační kaspázy začnou štěpit kaspázy efektorové a spustí se kaskáda proteolytických štěpení proteinů. Efektorové kaspázy začnou štěpit laminy, což jsou proteiny přiléhající k vnitřní straně jaderné membrány, a drží její tvar. Dojde ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA, degradaci buněčného cytoskeletu, zhuštění cytoplazmy a nakonec z buňky vzniknou apoptotická tělíska, která jsou odstraňována makrofágy. Jiný, také vnější způsob, je pomocí Fas receptoru (FasR), který se nachází na povrchu většiny buněk. Navázáním na Fas ligand (FasL), nacházející se na CTL buňkách, dojde k trimerizaci receptoru a k apoptóze. Rozhodovacím centrem o endogenní sebevraždě jsou mitochondrie, kdy dojde k uvolnění cytochromu c. Ten spustí oligomeraci proteinu APAF1, který na sobě seřadí příslušné kaspázy, ty se naštěpí a dojde k apoptóze. Odlišným dějem od apoptózy je nekróza, při které dojde k vyjití obsahu buňky do tkáně a může dojít k vážnému poškození. Další nedávno objevenou cestou, která vede k apoptóze, je skrz dráhu TRAIL/DR5. TRAIL je příbuzný TNF apoptózu indukující ligand. Blokace TRAIL/DR 5 (receptor smrti) významně přispívá ke snížení supresorové funkce Treg. Těchto výsledků bylo dosaženo in vitro i in vivo při užití anti-DR5 protilátek vedoucím k prodloužení přežití štěpu při transplantaci kůže (Ren et al. 2007).

10.3 OVLIVNĚNÍ METABOLISMU EFEKTOROVÝCH T BUNĚK

Dlouho diskutovaná věc je ovlivnění metabolismu vyčerpáním IL-2. Studie z poslední doby se shodují, že dochází k apoptóze, která je zprostředkovaná nedostatkem IL-2 (Pandiyan et al. 2007). Treg exprimují ve vysoké míře CD25, což může vést k veškerému vyčerpání IL-2 a k jeho nedostatku pro Tef. IL-2 je důležitý růstový faktor a je pro Treg buňky i pro Tef klíčovým cytokinem pro přežití. Treg buňky samy nedokáží produkovat IL-2. Nicméně některé studie toto vyvracejí a říkají, že k vyčerpání IL-2 nedochází.

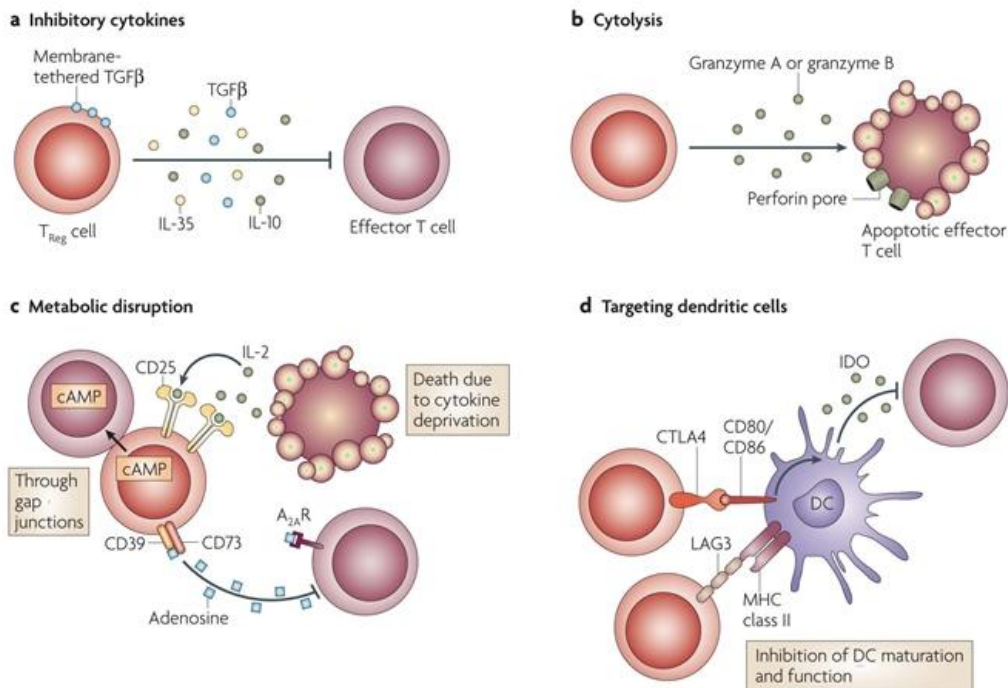
Byly objeveny další možné způsoby ovlivnění metabolismu Tef, a to uvolnění nukleosidu adenosinu. Současná exprese CD39 a CD73 na Treg buňkách se ukázala jako potřebná ke generování adenosinu do perinukleárního prostoru z extracelulárních nukleotidů, po kterém dojde k navázání na adenosin A2 receptor na Tef, čímž dojde k inhibici exprese IL-6 a k podpoře exprese TGF- β . IL-6 inhibuje generování Treg a podporuje produkci prozáněťových cytokinů jako je IL-17 (Deaglio et al. 2007). Proto je inhibice sekrece IL-6 důležitá k udržení Treg populace. Další možný způsob je přímý

přenos inhibičního druhého posla cAMP z Treg buněk do Tef skrz gap spojení. Zdá se, že díky nízké expresi cAMP fosfodiesterázy 3B v Treg buňkách, která degraduje cAMP, dochází v těchto buňkách k nahromadění cAMP. cAMP je možný inhibitor proliferace a syntézy IL-2 v T buňkách (Bopp et al. 2007).

10.4 MODULACE ZRÁNÍ A FUNKCE DENDRITICKÝCH BUNĚK

Treg mohou ovlivňovat maturaci a/nebo funkci DC, které jsou důležité pro aktivaci Tef. Dendritické buňky jsou v organismu nejdůležitější APC a jsou nezbytné pro zahájení adaptivní imunity. Intravitální mikroskopií byla odhalena přímá interakce DC s Treg buňkami in vivo. Důležitou roli hraje negativní regulátor aktivace CTLA-4 exprimován na Treg buňkách. Zdá se, že Treg buňky mohou skrz interakci CTLA-4 s kostimulační molekulou CD80 a/nebo CD86 podmiňovat expresi indoleaminu 2,3 – dioxygenázy (IDO) dendritickými buňkami. IDO indukuje katabolismus tryptofanu do pro-apoptotických metabolitů a výsledkem je suprese Tef. Aminolyselina tryptofan je důležitá pro správnou proliferaci a diferenciaci Tef (Fallarino et al. 2003).

Podle Cederbom et al. jsou Treg buňky schopné snížení exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86 na DC in vitro (Cederbom et al 2000).

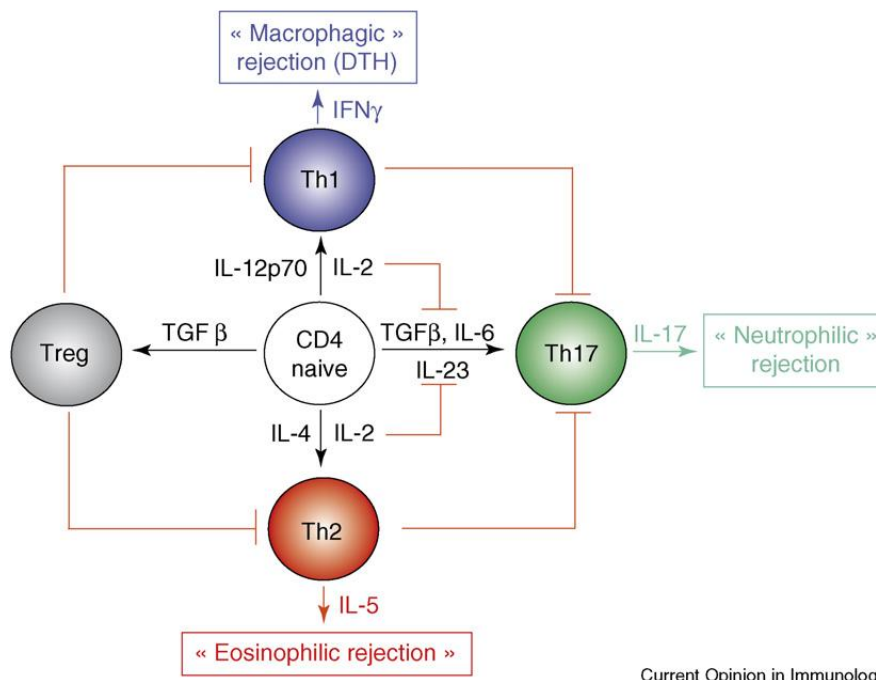


Obrázek 4. Schéma mechanismů používané Treg buňkami (převzato od Vignali et al. 2008).

11 BUNĚČNÉ MECHANISMY REJEKCE ŠTĚPU

Zda dojde k rejekci transplantovaného orgánu, či ne, závisí na řízené imunitní odpovědi namířené proti antigenům MHC exprimovaným na transplantovaných tkáních. Faktor, který představuje velkou překážku při transplantacích, je redundance mechanismů navozujících rejekci štěpu. Například u pacientů s transplantovanou ledvinou, kteří byli léčeni sirolimem a alemtuzumabem, převládala oproti buněčné humorální rejekce (Knechtle et al. 2003). U lidí, kteří jsou celý život vystavení opakovaným dávkám infekčních patogenů, se vytváří velké množství paměťových buněk. Právě paměťové CD8⁺ buňky představují hlavní bariéru k navození tolerance (Valujskikh 2006). Bylo prokázáno, že zbavení se CD8⁺ T lymfocytů umožňuje navození tolerance u transplantace ledvin/kostní dřeně u zvířecích modelů léčených anti-CD154 protilátkami v kombinaci s imunosupresivní léčbou (Koyama et al. 2007). CD4⁺ naivní buňky se podle přítomnosti konkrétního cytokinu v prostředí diferencují v odlišné typy buněk zprostředkovávající určitý způsob rejekce štěpu. V přítomnosti IL-12 dochází k produkci IFN- γ , a tím k rejekci zprostředkované makrofágy a ke vzniku přecitlivělosti oddáleného typu. V přítomnosti IL-4 dochází k diferenciaci Th2 buněk, a tím k produkci IL-5, který aktivuje eosinofily. K takto zprostředkované rejekci dojde, pokud je zabráněno vytvoření klasické cesty rejekce (Loser et al. 2007). Důležitý k navození tolerance je poměr Th17 a Treg buněk a obecně rovnováha mezi Tef a Treg. Treg buňky produkují TGF- β , a tak je možné, že přispívají k diferenciaci Th17 buněk, pro které je TGF- β klíčový spolu s IL-6 (Lohr et al. 2006). Bylo prokázáno, že IL-17 produkovaný Th17 buňkami aktivuje neutrofilů, a tím dojde k rejekci jimi způsobenou. Zdá se, že IL-9 produkovaný mastocyty má nepřímý vliv na udržení Treg buněk ve tkáních (Lu et al. 2006). Role B lymfocytů v rejekci štěpu je zatím nejasná. Podle několika studií nebyla nalezena žádná korelace mezi infiltrovanými B lymfocyty a odhojením štěpu ledviny i jater (Krukemeyer et al. 2004). Naopak u ledvinové cévní rejekce se zdá, že infiltrované plazmatické buňky byly zahrnuty v rejekci, tedy rejekce byla pravděpodobně zprostředkována protilátkami (Gärtner et al. 2006). Pravděpodobně i NK buňky se účastní odhojení štěpu, jak dokazuje blokáda kostimulačních receptorů NK buněk, po které dojde k prodloužení přežití štěpu. (Kim et al., presented at the World Transplant Congress, July 2006). Mechanismy, kterými NK buňky přispívají k akutní rejekci, nejsou zcela jasné. Pravděpodobně bude hrát roli IFN- γ vylučovaný aktivovanými NK buňkami, který ovlivňuje expresi MHC molekul

na endoteliích štěpu, a tím NK buňky přispívají k rozpoznání štěpu aloreaktivními T lymfocyty (Gerosa et al. 2005). Dále jsou zodpovědné za časnou produkci cytokinů, které ovlivňují cílení leukocytů do místa transplantované tkáně (Kondo et al. 2000).



Current Opinion in Immunology

Obrázek 5. Různé typy CD4⁺ T buněčných rejekcí (převzato od Alegre et al. 2007).

11.1 TYPY REJEKČÍ LEDVINOVÉHO ŠTĚPU

Příčina odhojení štěpu je rozpoznání MHC antigenů na ledvinovém štěpu a následně spuštění efektorových mechanismů vedoucích k aktivaci komplementu, intravaskulární trombóze, ischemii a nekróze tkáně. Těmito mechanismy jsou přímé rozpoznání dárcovské APC s peptidem navázaným na MHC, následné působení efektorových CD4⁺ a CD8⁺ buněk, přecitlivělost oddáleného typu zprostředkovaná makrofágy stimulované CD4⁺ a CD8⁺ buňkami přímou nebo nepřímou cestou a opsonizace štěpu s následnou aktivací komplementu.

Rozpoznání může probíhat přímou, nepřímou nebo semipřímou cestou. K přímému rozpoznání dojde, pokud na dárcovské APC s neporušenými, cizími MHC molekulami dojde k aktivaci CD4⁺ a CD8⁺ buněk (Warrens et al. 1994). Nepřímá cesta představuje zpracování dárcovského MHC komplexu a vystavení na MHC recipientní buňky (Lechler

and Batchelor 1982). V semipřímé cestě dojde k buněčnému kontaktu mezi dárcovskou APC a příjemcovou APC a vyměnění neporušeného MHC (Herrera et al. 2004).

Podle průběhu a času odhojení se rozlišuje několik typů rejekce: hyperakutní, akutní a chronická. K hyperakutní rejekci dochází během minut až hodin, ale nejpozději do 48 hodin. Dochází k ní, pokud jsou v krvi příjemce přítomné protilátky proti MHC antigenům buněk štěpu a štěp je poškozen aktivovaným komplementem. Protilátky spadají do dvou kategorií: nízkoafinní IgM protilátky vážící antigeny ABO krevních skupin a vysokoafinní IgG protilátky vážící HLA antigeny (Afzali et al. 2007). Je tedy nutné provést před každou transplantací cross-match test na přítomnost přirozených protilátek v krvi příjemce, určení krevních skupin a HLA typizaci. Podmínkou pro provedení transplantace je negativní cross-match test na protilátky, shoda ABO krevního systému a shoda nebo částečná shoda v HLA antigenech. K akutní rejekci může dojít během pár dní i do tří měsíců po transplantaci, pokud je přerušena imunosupresivní léčba. K poškození štěpu dojde díky aktivovaným $CD4^+$, $CD8^+$ buňkám a makrofágům příjemce zacílených na antigeny štěpu. Nejčastější příčinou ztráty funkce transplantované ledviny je chronická transplantační nefropatie. Jiný termín pro toto označení je chronická rejekce, což znamená pozdní ztrátu štěpu, ale procesy související s chronickou rejekcí můžou vzniknout velmi brzy po transplantaci. Výsledné poškození a ztráta štěpu je důsledkem celé řady procesů, přičemž zásadní roli hrají anti-HLA protilátky. Dochází k fibroprodukcii, poškození endotelu a poruchám prokrvení štěpu. Klinicky se chronická rejekce projevuje zhoršením funkce štěpu, proteinurií a vysokým krevním tlakem. Protokolární biopsie slouží ke zkoumání výskytu rizikových faktorů vzniku chronické transplantační nefropatie. Provádí se v pravidelných intervalech hlavně během prvního roku po transplantaci a hledá změny, které se ještě neprojevily na funkci ledviny. Výsledky ukázaly, že pacienti s chronickou transplantační nefropatií měli v době třetí protokolární biopsie horší renální funkci, vykazovali delší čas studené ischemie a ledvinu měli převážně od zemřelého dárce (Schwarz et al. 2005).

12 UPLATNĚNÍ T REGULAČNÍCH BUNĚK V RÁMCI TRANSPLANTACE LEDVIN

Častou příčinou chronického selhání ledvin (CKD) je glomerulonefritida. Jedná se o zánět glomerulů, což jsou okem neviditelná klubka cév zodpovědná za filtraci krve. Mechanismy glomerulárního poškození jsou dvojí: imunitní a neimunitní. Ke glomerulonefritidě, která je zprostředkována imunitní odpovědí, dochází, pokud T a B lymfocyty reagují na antigeny vlastní tkáně ledvin, a důsledkem je vznik deposite komplexů antigenů a protilátek ve filtračním sítu glomerulu. V odlišném případě může dojít ke vrozené odpovědi imunitního systému, kdy zánět souvisí se zraněním ledvin. V rámci zranění také dochází k porušení bazální membrány, která odděluje tubulární epitelální buňky (TEC) od intersticiálního a intravaskulárního prostoru, a výsledkem je fyzický kontakt TEC s lymfocyty. TEC mají schopnost chovat se jako neprofesionální APC a můžou tak aktivovat T lymfocyty (Hagerty and Allen 1992) nebo naopak v nich stimulovat vznik anergie (Singer et al. 1993). Regulační buňky jsou schopné tlumit imunitní odpověď efektorových lymfocytů proti antigenům tkáně ledvin, a tím snížit riziko poškození ledvin.

Regulační efekt Treg buněk je dobře znám, zdraví lidé a pacienti tolerantní vůči transplantované ledvině vykazují větší zastoupení cirkulujících a ve štěpu přítomných Treg buněk narozdíl od pacientů s chronickou rejekcí. Tolerance byla zrušena poškozením $CD4^+CD25^+$ buněk. Přítomnost histologických známek charakteristických pro akutní rejekci bez zjevných příznaků s dobře fungující ledvinou se nazývá subklinická rejekce. Je velmi užitečné určit ze štěpu protokolární biopsií průběh a stav transplantované ledviny. Studie prokázala, že přítomnost Foxp3 Treg buněk v tubulointersticiálním infiltrátu 6 měsíců po transplantaci koreluje se stabilním přijetím štěpu (Bestard et al. 2008). Treg buňky by tedy mohly být spolehlivými ukazateli stavu štěpu a umožňují rozlišit zánětlivé procesy od přijetí štěpu. To také dokazuje správnou funkci štěpu po 2 a 3 letech po transplantaci u pacientů mající v krvi Treg buňky (Bestard et al. 2008).

Efektivní terapeutické využití pro pacienty s CKD by mohl představovat genový přenos Foxp3 retrovirovým systémem do naivních T buněk, protože právě Foxp3 je zodpovědný za vývoj a funkci Treg buněk. Podle studie bylo výsledkem přenosu navození regulačního fenotypu u naivních buněk hlodavců (Wang et al. 2006). Problémem však zůstává dopravení vektoru do buněk ledvin.

Zajímavou možností, jak zabránit rejekci, je použití inhibitorů histon/proteinových deacetyláz (HDAC), které, jak studie ukázala, podporují expanzi Treg buněk a zabraňují tak rejekci transplantovaného orgánu nebo vzniku zánětlivého střevního onemocnění (Tao et al. 2007).

DC předkládají specifické antigeny polyklonálním Treg buňkám, které se tak změní na antigen-specifické buňky. Ty jsou tak více schopnější tlumit imunitní odpovědi (Tarbell et al. 2007). Podporují expanzi Treg buněk prostřednictvím uvolněním IL-10 a zvětšením exprese IDO (Lewkowich et al. 2005). Navíc Treg buňky snižují schopnost DC prezentovat antigeny T lymfocytům, a tím nedochází k jejich aktivaci (Larmonier et al. 2007).

Jak bude popsáno později, transplantace ledvin se zatím neobejde bez imunosupresivní léčby, která má řadu nevýhod. Je tu potenciální možnost ukončení léčby u pacientů, u kterých by ale bylo jednoznačně jasné, že snížení nebo přerušení léčby nebude mít za následek rejekci. Cílem studie od Kreijveld et al. bylo najít konkrétní znaky T buněk z pacientů po transplantaci ledviny, které by sloužily k predikci výskytu akutní rejekce následující po přerušení léčby takrolimem. Analýzou průtoková cytometrie T buněk bylo zjištěno, že nejvíce informativní známkou rejekce je poměr paměťových T buněk a Treg buněk hodnocených těsně před přerušením léčby a změny v distribuci naivních, efektorových a paměťových buněk v průběhu času (Kreijveld et al. 2008).

13 ROZDĚLENÍ IMUNOSUPRESIVNÍCH LÉČIV

Imunosupresiva slouží k potlačení aktivity ke štěpu specifických aloreaktivních T buněk, a tím k zabránění rejekce štěpu. Je ale bohužel časté, že pacient zemře s dobře fungující transplantovanou ledvinou v důsledku vedlejších efektů imunosupresiv na tělo. Mezi ně patří například hypertenze, vznik malignit, infekcí, potransplantační diabetes, nefrotoxicita a poškození ledviny.

Vhodná imunosupresivní léčba by měla zabránit rejekci štěpu a zároveň nezamezovat vzniku protiinfekční imunity. Toto lze vyjádřit indexem imunitní účinnosti. Imunosupresivní léčba se standardně dělí na čtyři skupiny a to na poškozující činitele, inhibitory časně aktivace T lymfocytů, inhibitory pozdní aktivace T lymfocytů a inhibitory proliferace T lymfocytů. Proti zabránění vzniku GVHD a akutní rejekci se používá antithymocytový globulin (ATG). Mechanismus působení je indukce apoptózy, komplement dependentní lýze a působení na chemokinové receptory odpovědných za migraci lymfocytů do příslušného místa (Mohty 2007).

Do skupiny inhibitorů časně aktivace T lymfocytů patří kalcineurinové inhibitory (CNI), kam se řadí Cyklosporin A a takrolimus. Po aktivaci T lymfocytu skrz TCR a prezentace dárcovského peptidu na MHC molekule dojde ke kalcium dependentní vnitrobuněčné signalizaci, která aktivuje kalcium/kalmodulín dependentní fosfatázu kalcineurin. Ta defosforyluje transkripční faktor NFAT, který se tak může translokovat do jádra, a tam pomáhat transkripčním faktorům vázat se na geny kódující prozánětlivé cytokiny. CNI se v cytoplazmě váží na jejich imunofiliny a blokují aktivitu kalcineurinu, a tak zabraňují translokaci transkripčního faktoru NFAT do jádra regulujícího produkci IL-2. Cyklosporin se váže na cyklofilin a takrolimus na FK506-vázající protein (FKBP12) (Battaglia 2010). CNI jsou spojovány se vznikem nefrotoxicity, jejich stažení mělo za následek zlepšenou funkci ledvin a zlepšení krevního tlaku, nicméně se zvyšuje riziko akutní rejekce.

Daklizumab a rapamycin patří do třetí skupiny imunosupresiv. Daklizumab je monoklonální anti-CD25 protilátka vážící se na CD25, a tak brání nasednutí IL-2 (Battaglia 2010). Rapamycin neboli sirolimus byl nejprve identifikován jako produkt bakterie *Streptomyces hygroscopicus*. Ze začátku byl používán jako protiplísňové činidlo, teprve potom se začal užívat k prevenci odmítnutí ledvinového štěpu pro jeho vlastnosti zahrnující inhibici proliferace a schopnost suprese. Rapamycin patří do skupiny

imunosupresiv nazvaných inhibitory savčích rapamycinových cílů (mTOR). Rapamycin se váže na FKBP12, ale nepůsobí na kalcineurinovou aktivitu, nýbrž komplex rapamycin/FKBP12 je vysoce specifický inhibitor mTOR komplexu 1 (mTORC1), což je serin/threonin kináza zahrnutá ve fosfatidylinositolové signální cestě (Mita et al. 2003). Experimentální studie dokazují, že u pacientů s transplantovanou ledvinou dochází po lymfopénii indukované užitím Campath-1H, calcineurin-dependentní signalizaci a přidáním sirolimu k expanzi Treg buněk (Noris et al. 2007).

Mykofenolát mofetil (MMF) používán pro prevenci odmítnutí štěpu, je inhibitor proliferace buněk a v játrech je přetvářen na aktivní komponentu, mykofenolátovou kyselinu, která působí na inosin monofosfát dehydrogenázu, klíčový enzym pro syntézu guanosinových nukleotidů nezbytných pro syntézu DNA (Battaglia 2010).

13.1 VLIV IMUNOSUPRESIV NA T REGULAČNÍ BUŇKY

Úspěšná transplantace ledviny závisí na chirurgickém zákroku a také na správně zvolené imunosupresivní léčbě. Je důležité vzít v potaz vliv imunosupresiv na přežití Treg buněk, na jejich proliferaci a na funkci.

ATG je králíčí (rATG) polyklonální protilátka proti lidským T buňkám. In vitro rATG mají vliv na rychlou expanzi $CD4^+ CD25^-$ buněk na $CD4^+ CD25^+$ buňky (Lopez et al. 2006). Zdá se ale, že nemají vliv na produkci IL-10.

CNI mají škodlivý dopad na Treg buňky in vivo z důvodu inhibice produkce IL-2, který je pro Treg buňky klíčovým cytokinem (De Serres et al. 2009). Na produkci IL-10 CNI pravděpodobně vliv nemají, naopak bylo zjištěno větší množství IL-10 u skupiny pacientů se stabilním štěpem léčených CNI léčbou (Mittal et al. 2009).

Zdá se, že i Daklizumab nepůsobí pouze na aktivované T lymfocyty. Ukázalo se, že po 7 a půl měsících anti-25 mAb terapie u pacientů s roztroušenou sklerózou ubylo 44 % $CD4^+ Foxp3^+$ T buněk (Oh et al. 2009). Nedojde ale k jejich smrti, pouze k necitlivosti k IL-2 a po odklizení mAb dojde k navrácení původního počtu Treg buněk (Kreijveld et al. 2007). Produkci IL-10 snad Daklizumab neovlivňuje.

Zdá se, že rapamycin umožňuje proliferaci a expanzi myších a lidských nTreg buněk. Data ukazují, že pacienti po transplantaci ledviny léčení rapamycinem, měli zvětšený počet nTreg buněk v porovnání s celkovým množstvím $CD4^+$ buněk (Noris et al. 2007). In vitro data ukazují značné rozdílnosti. Podle Valmori et al. rapamycin spíše podporuje

indukci supresorové funkce u tradičních CD4⁺ buněk než přímo expanzi nTreg buněk (Valmori et al. 2006). Vliv na funkci Tr1 není zatím jasný, ale je možné, že na generování Tr1 buněk in vivo vliv rapamycin má, protože mTORC1 podporuje expresi IL-10 a po přidání rapamycinu dochází k velkému snížení produkce IL-10 fagocyty (Baker et al. 2009). MMF pravděpodobně žádný vliv na Treg buňky nemá (Lim et al. 2007).

14 ZÁVĚR

Ztráta štěpu zapříčiněná akutní rejekcí je díky imunosupresivní léčbě převážně překonána, problémem ale zůstává vznik vedlejších efektů imunosupresivních léků. Jedna polovina příjemců ledviny zemře převážně na kardiovaskulární příčiny často zapříčiněné vedlejšími efekty imunosupresiv, nicméně s funkční ledvinou (Pascual et al. 2002).

V některých málo se vyskytujících případech byla u pacientů s nemyeloablativní alogenní transplantací krvetvorných buněk pozorována transplantační tolerance k ledvinovému štěpu od stejného dárce. Tím by navození smíšeného chimérismu mohlo výrazně podpořit přijetí štěpu. Ve studii od Fudaba et al. byla u šesti pacientů současně provedená transplantace ledviny a kostní dřeně od HLA-identických sourozeneckých dárců, která následovala po nemyeloablativních podmínkách zahrnující užití cyklofosfoamidu (CP), antithymocytárního globulínu a ozáření thymu. Potransplantačně byl pacientům dán Cyklosporin A následně po infúzi dárcovských leukocytů. Dlouhotrvající přijetí štěpu bylo pozorováno u všech šesti pacientů. (Fudaba et al. 2006).

Je potřeba dalších výzkumů k identifikaci molekul specifických právě pro Treg buňky, protože v současné době známé znaky Treg buněk nejsou jednoznačně specifické pro Treg buňky. To značně komplikuje jejich odlišení od ostatních buněk. Navíc pokud se najde opravdu konkrétní marker u pacientů poskytující nám jistotu, že u nich může dojít k přerušení imunosupresivní léčby, bude to znamenat pro všechny příjemce transplantované ledviny obrovské zlepšení kvality jejich životů.

15 POUŽITÁ LITERATURA

- Afzali, B., R. I. Lechler & M. P. Hernandez-Fuentes (2007) Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*, 69, 545-56.
- Alegre, M. L., S. Florquin & M. Goldman (2007) Cellular mechanisms underlying acute graft rejection: time for reassessment. *Curr Opin Immunol*, 19, 563-8.
- Allan, S. E., S. Q. Crome, N. K. Crellin, L. Passerini, T. S. Steiner, R. Bacchetta, M. G. Roncarolo & M. K. Levings (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*, 19, 345-54.
- Allan, S. E., L. Passerini, R. Bacchetta, N. Crellin, M. Dai, P. C. Orban, S. F. Ziegler, M. G. Roncarolo & M. K. Levings (2005) The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest*, 115, 3276-84.
- Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman & F. Powrie (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, 190, 995-1004.
- Baker, A. K., R. Wang, N. Mackman & J. P. Luyendyk (2009) Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages by reducing IL-10 expression. *Mol Immunol*, 46, 2249-55.
- Battaglia, M. (2010) Potential T regulatory cell therapy in transplantation: how far have we come and how far can we go? *Transpl Int*, 23, 761-70.
- Bestard, O., J. M. Cruzado, I. Rama, J. Torras, M. Gomà, D. Serón, F. Moreso, S. Gil-Vernet & J. M. Grinyó (2008) Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol*, 19, 2020-6.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit & E. Schmitt (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, 204, 1303-10.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler & F. Ramsdell (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27, 68-73.
- Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms & T. J. Ley (2007) Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27, 635-46.
- Cederbom, L., H. Hall & F. Ivars (2000) CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, 30, 1538-43.
- Chen, W. & S. M. Wahl (2003) TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 85-9.
- De Serres, S. A., M. H. Sayegh & N. Najafian (2009) Immunosuppressive drugs and Tregs: a critical evaluation! *Clin J Am Soc Nephrol*, 4, 1661-9.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enyooji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom & S. C. Robson (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 204, 1257-65.
- Deenick, E. K. & S. G. Tangye (2007) Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol*, 85, 503-5.

- Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre & P. Puccetti (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4, 1206-12.
- Fudaba, Y., T. R. Spitzer, J. Shaffer, T. Kawai, T. Fehr, F. Delmonico, F. Preffer, N. Tolkoff-Rubin, B. R. Dey, S. L. Saidman, A. Kraus, T. Bonnefoix, S. McAfee, K. Power, K. Kattleman, R. B. Colvin, D. H. Sachs, A. B. Cosimi & M. Sykes (2006) Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: in vivo and in vitro analyses. *Am J Transplant*, 6, 2121-33.
- Gerosa, F., A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra & G. Trinchieri (2005) The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol*, 174, 727-34.
- Gärtner, V., T. K. Eigentler & R. Viebahn (2006) Plasma cell-rich rejection processes in renal transplantation: morphology and prognostic relevance. *Transplantation*, 81, 986-91.
- Hagerty, D. T. & P. M. Allen (1992) Processing and presentation of self and foreign antigens by the renal proximal tubule. *J Immunol*, 148, 2324-30.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, R. Tibbott, F. Salcido Ochoa, M. J. James, F. M. Marelli-Berg & R. I. Lechler (2004) A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol*, 173, 4828-37.
- Kondo, T., K. Morita, Y. Watarai, M. B. Auerbach, D. D. Taub, A. C. Novick, H. Toma & R. L. Fairchild (2000) Early increased chemokine expression and production in murine allogeneic skin grafts is mediated by natural killer cells. *Transplantation*, 69, 969-77.
- Koyama, I., O. Nadazdin, S. Boskovic, T. Ochiai, R. N. Smith, M. Sykes, H. Sogawa, T. Murakami, T. B. Strom, R. B. Colvin, D. H. Sachs, G. Benichou, A. B. Cosimi & T. Kawai (2007) Depletion of CD8 memory T cells for induction of tolerance of a previously transplanted kidney allograft. *Am J Transplant*, 7, 1055-61.
- Kreijveld, E., H. J. Koenen, I. S. Klasen, L. B. Hilbrands & I. Joosten (2007) Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+CD25+ regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients. *Am J Transplant*, 7, 249-55.
- Kreijveld, E., H. J. Koenen, B. van Cranenbroek, E. van Rijssen, I. Joosten & L. B. Hilbrands (2008) Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS One*, 3, e2711.
- Krukemeyer, M. G., J. Moeller, L. Morawietz, B. Rudolph, U. Neumann, T. Theruvath, P. Neuhaus & V. Krenn (2004) Description of B lymphocytes and plasma cells, complement, and chemokines/receptors in acute liver allograft rejection. *Transplantation*, 78, 65-70.
- Larmonier, N., M. Marron, Y. Zeng, J. Cantrell, A. Romanoski, M. Sepassi, S. Thompson, X. Chen, S. Andreansky & E. Katsanis (2007) Tumor-derived CD4(+)CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10. *Cancer Immunol Immunother*, 56, 48-59.
- Lechler, R. I. & J. R. Batchelor (1982) Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med*, 155, 31-41.
- Lewkowich, I. P., N. S. Herman, K. W. Schleifer, M. P. Dance, B. L. Chen, K. M. Dienger, A. A. Sproles, J. S. Shah, J. Köhl, Y. Belkaid & M. Wills-Karp (2005) CD4+CD25+ T cells

- protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*, 202, 1549-61.
- Lim, D. G., I. Y. Joe, Y. H. Park, S. H. Chang, Y. M. Wee, D. J. Han & S. C. Kim (2007) Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. *Transpl Immunol*, 18, 94-100.
- Lohr, J., B. Knoechel, J. J. Wang, A. V. Villarino & A. K. Abbas (2006) Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *J Exp Med*, 203, 2785-91.
- Lopez, M., M. R. Clarkson, M. Albin, M. H. Sayegh & N. Najafian (2006) A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol*, 17, 2844-53.
- Loser, K., J. Apelt, M. Voskort, M. Mohaupt, S. Balkow, T. Schwarz, S. Grabbe & S. Beissert (2007) IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J Immunol*, 179, 365-71.
- Lu, L. F., E. F. Lind, D. C. Gondek, K. A. Bennett, M. W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z. A. Scott, A. J. Coyle, J. L. Reed, J. Van Snick, T. B. Strom, X. X. Zheng & R. J. Noelle (2006) Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, 442, 997-1002.
- Malek, T. R. & A. L. Bayer (2004) Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol*, 4, 665-74.
- Mita, M. M., A. Mita & E. K. Rowinsky (2003) The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther*, 2, S169-77.
- Mittal, S. K., R. K. Sharma, A. Gupta & S. Naik (2009) Increased interleukin-10 production without expansion of CD4+CD25+ T-regulatory cells in early stable renal transplant patients on calcineurin inhibitors. *Transplantation*, 88, 435-41.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov & S. Sakaguchi (2009) Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 30, 899-911.
- Mohty, M. (2007) Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia*, 21, 1387-94.
- Noris, M., F. Casiraghi, M. Todeschini, P. Cravedi, D. Cugini, G. Monteferrante, S. Aiello, L. Cassis, E. Gotti, F. Gaspari, D. Cattaneo, N. Perico & G. Remuzzi (2007) Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs. *J Am Soc Nephrol*, 18, 1007-18.
- Oh, U., G. Blevins, C. Griffith, N. Richert, D. Maric, C. R. Lee, H. McFarland & S. Jacobson (2009) Regulatory T cells are reduced during anti-CD25 antibody treatment of multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 66, 471-9.
- Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed & M. J. Lenardo (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 8, 1353-62.
- Pascual, M., T. Theruvath, T. Kawai, N. Tolkoff-Rubin & A. B. Cosimi (2002) Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med*, 346, 580-90.

- Perruche, S., P. Zhang, Y. Liu, P. Saas, J. A. Bluestone & W. Chen (2008) CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells. *Nat Med*, 14, 528-35.
- Perumal, N. B. & M. H. Kaplan (2011) Regulating IL9 transcription in T helper cells. *Trends Immunol*, 32, 146-50.
- Read, S., V. Malmström & F. Powrie (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*, 192, 295-302.
- Ren, X., F. Ye, Z. Jiang, Y. Chu, S. Xiong & Y. Wang (2007) Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ*, 14, 2076-84.
- Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino & D. A. Hafler (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 10, 490-500.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh & M. Toda (1995) 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*, 155, 1151-64.
- Sakaguchi, S., K. Wing & M. Miyara (2007) Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1, S116-23.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura & M. Ono (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133, 775-87.
- Schumacher, A., P. O. Wafula, A. Z. Bertoja, A. Sollwedel, C. Thuere, I. Wollenberg, H. Yagita, H. D. Volk & A. C. Zenclussen (2007) Mechanisms of action of regulatory T cells specific for paternal antigens during pregnancy. *Obstet Gynecol*, 110, 1137-45.
- Schwarz, A., M. Mengel, W. Gwinner, J. Radermacher, M. Hiss, H. Kreipe & H. Haller (2005) Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: a protocol biopsy study. *Kidney Int*, 67, 341-8.
- Setoguchi, R., S. Hori, T. Takahashi & S. Sakaguchi (2005) Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, 201, 723-35.
- Shimizu, J., S. Yamazaki & S. Sakaguchi (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*, 163, 5211-8.
- Singer, G. G., H. Yokoyama, R. D. Bloom, A. M. Jevnikar, N. Nabavi & V. R. Kelley (1993) Stimulated renal tubular epithelial cells induce anergy in CD4+ T cells. *Kidney Int*, 44, 1030-5.
- Stockis, J., D. Colau, P. G. Coulie & S. Lucas (2009) Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol*, 39, 3315-22.
- Tao, R., E. F. de Zoeten, E. Ozkaynak, C. Chen, L. Wang, P. M. Porrett, B. Li, L. A. Turka, E. N. Olson, M. I. Greene, A. D. Wells & W. W. Hancock (2007) Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. *Nat Med*, 13, 1299-307.
- Tarbell, K. V., L. Petit, X. Zuo, P. Toy, X. Luo, A. Mqadmi, H. Yang, M. Suthanthiran, S. Mojsov & R. M. Steinman (2007) Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+

- CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med*, 204, 191-201.
- Valmori, D., V. Tosello, N. E. Souleimanian, E. Godefroy, L. Scotto, Y. Wang & M. Ayyoub (2006) Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells. *J Immunol*, 177, 944-9.
- Vignali, D. A., L. W. Collison & C. J. Workman (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8, 523-32.
- Wang, R., L. Kozhaya, F. Mercer, A. Khaitan, H. Fujii & D. Unutmaz (2009) Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13439-44.
- Wang, Y. M., G. Y. Zhang, Y. Wang, M. Hu, H. Wu, D. Watson, S. Hori, I. E. Alexander, D. C. Harris & S. I. Alexander (2006) Foxp3-transduced polyclonal regulatory T cells protect against chronic renal injury from adriamycin. *J Am Soc Nephrol*, 17, 697-706.
- Warrens, A. N., G. Lombardi & R. I. Lechler (1994) Presentation and recognition of major and minor histocompatibility antigens. *Transpl Immunol*, 2, 103-7.
- Watanabe, N., S. Hanabuchi, V. Soumelis, W. Yuan, S. Ho, R. de Waal Malefyt & Y. J. Liu (2004) Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol*, 5, 426-34.
- Wildin, R. S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J. L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F. D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby & M. E. Brunkow (2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*, 27, 18-20.
- Williams, L. M. & A. Y. Rudensky (2007) Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol*, 8, 277-84.
- Xu, L., A. Kitani, I. Fuss & W. Strober (2007) Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol*, 178, 6725-9.

Internetové zdroje:

www.biologend.com