

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Barbora Brožová

Mechanismy navození imunologické tolerance při orgánových transplantacích

Mechanisms of immune tolerance induction in organ transplatations

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

Praha, 2015

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, 13. 5. 2015

Podpis

Barbora Brožová

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc. za věnovaný čas a odborné rady při psaní této práce. Zároveň bych ráda poděkovala rodině a svému příteli za podporu a trpělivost během studia, které si velice vážím.

Abstrakt

Pod pojmem transplantační tolerance se považuje dlouhodobé přežívání funkčního štěpu bez potřeby imunosupresivní léčby. U experimentálních modelů existuje mnoho způsobů navození tolerance, avšak do klinické praxe převedeny nebyly. V současné době se používá mnoho farmakologických imunosupresiv, jejichž smyslem je umožnit organismu akceptovat přítomnost štěpu a také zachovat obranyschopnost příjemce. Výsledky některých studií prokázaly, že se však dávky imunosupresiv dají snížit na minimum, v několika případech pacienti přežívají dlouhá léta bez imunosuprese. Budoucnost imunologické tolerance se vkládá do vývoje biomarkerů či do využití mezenchymálních kmenových buněk. Cílem této práce je shrnout současné poznatky mechanismů imunologické tolerance při orgánových transplantacích a pokusit se nalézt perspektivní cíle, kterými by mohl být další výzkum směřován.

Klíčová slova: imunologická tolerance, orgánové transplantace, rejekce, imunosuprese, imunomodulace

Abstract

The term transplantation tolerance is considered for a long-term graft survival without the need of immunosuppressive therapy. In experimental models, there are many ways to induce the tolerance but have not been transferred into clinical practice, yet. Currently used pharmacological immunosuppression is designed to allow the body to accept the presence of graft and also to preserve the immune system of the recipient. Results of some studies have shown that doses of immunosuppressive agents can be reduced to a minimum and patients might survive for years without an immunosuppression in few cases. The future of immunological tolerance is associated with the development of biomarkers or the use of mesenchymal stem cells. The aim of this thesis is to summarize current knowledge of mechanisms of immunological tolerance in organ transplantations and try to find prospective targets, which could be directed to further research.

Keywords: immune tolerance, organ transplantations, rejection, immunosuppression, immunomodulation

Obsah

Úvod.....	1
1 Mechanismy imunitní reakce proti transplantovanému štěpu.....	2
1.1 Akutní T- buňkami zprostředkovaná (celulární) rejekce.....	2
1.2 Protilátkami zprostředkovaná (humorální) rejekce	3
1.2.1 Hyperakutní rejekce	3
1.2.2 Akutní humorální rejekce.....	3
1.2.3 Chronická rejekce.....	4
2 Imunologická tolerance centrální a periferní	5
2.1 Centrální imunologická tolerance.....	5
2.1.1 Pozitivní selekce.....	5
2.1.2 Negativní selekce	5
2.2 Periferní imunologická tolerance.....	6
2.2.1 Klonální delece.....	6
2.2.2 Klonální anergie	6
2.2.3 Klonální ignorace	7
2.2.4 Suprese	7
3 Buňky a cytokiny účastníci se navození imunologické tolerance.....	9
3.1 T regulační buňky.....	9
3.2 B regulační buňky.....	10
3.2.1 Nezralé lidské Bregs.....	10
3.2.2 Vrozené lidské Bregs	10
3.3 M2 makrofágy	11
3.3.1 Makrofágy účastníci se hojení.....	11
3.3.2 Regulační makrofágy	12
3.3.3 Tumorem asociované makrofágy (TAM)	12
4 Navození transplantační tolerance v experimentu	13

4.1	Antigeny alogenního původu.....	13
4.2	Ozářením	13
5	Klinické studie k indukci transplantační tolerance	14
5.1	Polyklonální protilátky	14
5.2	Monoklonální protilátky	14
5.2.1	Muromonab	14
5.2.2	Basiliximab, daklizumab	14
5.2.3	Alemtuzumab	15
5.2.4	Rituximab	15
5.2.5	Belatacept	15
5.2.6	Intravenózní imunoglobuliny	15
5.2.7	Bortezomib	16
6	Perspektivní cíle imunomodulace vedoucí k navození transplantační tolerance.....	17
6.1	Dendritické buňky	18
6.2	Chimerismus.....	18
	Závěr.....	19
	Seznam zkratek	20
	Seznam literatury.....	23

Úvod

Náhrada tkáně se pohybuje od transfuze červených krvinek po léčbu anémie, transfuze destiček pro léčbu trombocytopenie, transplantace jednotlivých orgánů jako jsou ledviny, játra, srdce, slinivka břišní a v neposlední řadě také transplantace obličeje.

Nejvyšším cílem transplantací je stav trvalé transplantační tolerance bez další péče farmakologické imunosuprese. I přesto, že je známé úspěšné odstavení pacientů mimo farmakologickou imunosupresi, jedná se spíše o výjimku než pravidlo.

Většina pacientů tedy vyžaduje celoživotní imunosupresivní léčbu, aby nedošlo k rejekci štěpu. Avšak imunosuprese využívající se proti akutní rejekci často selhává při kontrole chronické rejekce a tato léčba je spojena s řadou nežádoucích účinků. Léčba posledního stádia chronické rejekce je také spojena s vysokými ekonomickými náklady.

Cílem této práce je na základě odborně psané literatury shrnout současné poznatky ohledně imunologické tolerance při transplantovaných orgánech, popsat několik farmakologických imunosupresiv a pokusit se najít perspektivní cesty vedoucí k trvalé imunologické tolerance u transplantací.

1 Mechanismy imunitní reakce proti transplantovanému štěpu

1.1 Akutní T- buňkami zprostředkovaná (celulární) rejekce

Pro akutní celulární rejekce je typické zasažení NK buňkami, makrofágy a CD4+, CD8+ T buňkami.

Nejprve jsou CD4+ buňky aktivovány dárcovými APC buňkami buď ve štěpu, nebo v lymfatických orgánech. Aktivovány jsou díky cytokinům typu Th1, zejména IFN γ , který je produkován CD4+ buňkami a slouží k aktivaci CD8+ cytotoxických lymfocytů. Tyto buňky migrují do štěpu, kde napadají buňky parenchymu. Jen CD8+ cytotoxické T buňky, které jsou indukovány přímou cestou HLA aloantigenů mohou zabít buňky štěpu exprimující tyto antigeny. Takto asociované CD8+ T buňky příjemce využívají tři způsoby cytotoxických mechanismů.

Prvním z těchto mechanismů je interakce Fas receptoru a jeho ligandu FasL. Cytotoxické T buňky mají na svém povrchu vysoce exprimovaný FasL, na které se naváže Fas receptor, který se nachází na povrchu mnoha buněk. Toto navázání vede k zahájení apoptózy v cílové buňce (Kägi et al. 1996). Dále mají cytotoxické T lymfocyty v cytoplazmě granule obsahující granzymy A, B a perforin. Poté, co rozezná cílovou buňku, přesunou se granule k plazmatické membráně a vylijí svůj obsah v místě dotyku. Perforin v cílové membráně tvoří póry, kterými se dostanou do buňky granzymy. Ty svým působením štěpí kaspázy, a tím aktivují kaskádu vedoucí k programované buněčné smrti. Třetím způsobem je sekrece lymfotoxinu, který také indukuje apoptózu. U tohoto mechanismu nedochází ke styku s cílovou buňkou (Schmid et al., 1986).

Po přímém i nepřímém rozpoznání HLA molekul se pomocné T lymfocyty (CD4+, Th) diferencují do různých podtypů (Th1, Th2, Th3, Th17 a T regulační lymfocyty) vlivem cytokinů. Th1 lymfocyty se diferencují v přítomnosti cytokinu IL-12 a produkují IL-2, IFN- γ a TNF- α . IFN- γ aktivuje makrofágy, které produkují toxický oxid dusný, reaktivní kyslíkové radikály aj. Ve štěpu vyvolají reakci, která připomíná přecitlivělost oddáleného typu. Th2 podtyp je indukován cytokinem IL-4. Produkci IL-4, IL-5 a IL-13 se aktivují eozinofily do štěpu a ty uvolní granule s enzymy poškozující štěp (Martinez et al., 1993). Th2 lymfocyty pomáhají B lymfocytům k produkci protilátek, které se účastní humorální rejekce.

1.2 Protilátkami zprostředkovaná (humorální) rejekce

1.2.1 Hyperakutní rejekce

Hyperakutní rejekce se může vyskytnout několik minut až hodin po transplantaci, nejčastěji do 48 hodin. Tento typ rejekce nastane v případě, že předem vytvořené preformované protilátky příjemce orgánu, mají v plasmě vysokou hladinu. Při hyperakutní rejekci dochází k vazbě preformovaných protilátek na endotelové buňky štěpu a aktivují koagulační, komplementovou a kinázovou kaskádu, což vede k intravaskulární trombóze, ischémii a následně k nekróze. Přítomnost těchto protilátek je z 99% dána dřívější imunizací např. transfuzí nebo těhotenstvím. U 1% populace se preformované protilátky vyskytují bez zjevného důvodu (Afzali et al., 2007). Hyperakutní rejekce je též asociována s krevními destičkami a neutrofily, vyskytujícími se v peritubulárních a glomerulárních kapilárách (Racusen and Haas, 2006).

Z důvodu předtransplantačních testů, např. zjištění přítomnosti donor-specifických protilátek (DSA) pomocí komplement-dependentního cytotoxického testu (CDC test), se dnes hyperakutní rejekce vyskytují jen zřídka.

1.2.2 Akutní humorální rejekce

V případě absence předem vytvořených protilátek může být štěp odmítnut nejčastěji mezi 5. dnem a 3. měsícem po transplantaci. Při akutní rejekci se histologické nálezy vyznačují difuzním intersticiálním buněčným infiltrátem, který je složen z CD4 a CD8 T-buněk, kde dominuje CD8. Vzhledem k tomu, že většina akutních rejekcí je zaměřena proti cévám, infiltrované buňky jsou nalezeny v intimně arterií, T-buňky jsou zpravidla v minoritě.

V případě akutní humorální rejekce produkce aloprotilátek probíhá za pomoci CD4+ T lymfocytů. T buňky pomáhají B buňkám produkovat aloprotilátky a přepnout protilátky IgM na jiné izotypy, včetně IgG. V případě alogenních transplantací tkání T buňky jsou aktivovány přímým rozeznáním antigenu na APC dárce nebo nepřímo peptidy dárcovských antigenů. Byly navrženy dva způsoby spolupráce T a B buněk, které jsou možné díky nepřímé cestě prezentace CD4+ T lymfocytů. V prvním by mohly být B buňky stimulovány HLA antigeny I na APC dárce a CD4+ HLA antigeny II na stejné buňce, tzn., že lymfocyty jsou v těsné blízkosti, ale bez interakce mezi T buněčným receptorem a třídou antigenu II na B buňce. V druhém případě by B buňky byly stimulovány antigeny I. třídy dárcovské buňky a CD4+ jsou stimulovány cizími peptidy na antigenech II. třídy na APC příjemce. Tyto CD4+ pak mohou interagovat s B buňkami tak, že HLA antigeny II T buněk rozpoznají peptidy B buněk.

1.2.3 Chronická rejekce

Chronická rejekce je hlavní příčinou selhání transplantovaného štěpu v dlouhodobém období po transplantaci, řádově měsíce až roky. Tento typ rejekce je způsoben mnoha faktory – imunologickými a neimunologickými. Účastní se na ní humorální i celulární složky imunitního systému. U transplantace ledvin může také dojít k chronické nefropatii štěpu, což znamená, že může mít za následek až úplnou ztrátu funkce štěpu. Dochází při ní k duplicitě bazální membrány glomerulů a peritubulárních kapilár. Dalšími příznaky chronické rejekce jsou také hypertenze, proteinurie a v pokročilém stadiu také dysfunkce štěpu.

2 Imunologická tolerance centrální a periferní

2.1 Centrální imunologická tolerance

2.1.1 Pozitivní selekce

Všechny T lymfocyty podstupující ať pozitivní, tak negativní selekci dozrávají v brzlíku (Griesemer et al., 2010). Průměrná DP (double-positive) buňka žije 3-4 dny a její osud závisí na schopnosti vhodného upravování interakcí TCR s molekulami MHC. Mnoho MHC molekul dokáže předkládat samostatně peptidy a pozitivní selekce je sdružuje do komplexů (Barton and Rudensky, 1999). Více než 95% DP buněk nedokáže vytvořit vazbu k MHC ligandu, tedy většina buněk zanikne. Část, která je schopna s nízkou aviditou navázání na MHC ligand navodí zrání DP buněk na CD4+ nebo CD8+ (Starr et al., 2003).

2.1.2 Negativní selekce

Díky vypuštění autoreaktivních T buněčných klonů dochází uvnitř brzlíku k toleranci. Rozdíl mezi afinitami je pro thymocyty rozhodující. V případě s T buněk má receptor k vlastním antigenům vyšší afinitu, vede k vypuštění thymocytů apoptózou (Starr et al., 2003). Thymocyty s nízkou afinitou k TCR přežijí a pokračují v dalším zrání. Fas, který je členem rodiny TNF, má roli při vývoji apoptózy ve zrajících thymocytech (Kishimoto a Sprent 1997). Silná vazba stimuluje rychlý nástup Fas dependentních apoptózy naivních T buněk (Kishimoto and Sprent, 1999). Dalším požadovaným signálem je negativní selekce, která je kostimulací hlavně mezi interakcemi APC s CD28. V nepřítomnosti kostimulace anti-TCR dochází k apoptóze thymocytů (Punt et al., 1994).

Studie prokázaly roli B7-1 (CD80) a B7-2 (CD86) v negativní selekci. Tyto signály jsou zprostředkovány pomocí CD28. CTLA-4 a CD28 mají protichůdné funkce v negativní selekci, protože CTLA-4 poskytuje signály, které inhibují indukci (Buhmann et al., 2003). V tkáních bohatých na APC oblasti interagují thymocyty s ko-stimulačními molekulami (CD80, CD86). Jsou vyjádřeny v thymu jako epitelové buňky (TEC) nebo jako dendritické buňky. Avšak signalizace TCR vede k apoptóze přes Fas/FasL dráhu, která se vyskytuje v kůře thymu (Kishimoto et al., 1998).

V nedávné době se objevil transkripční regulátor v brzlíku pojmenovaný Aire. Je exprimován v epitelových buňkách medulárního brzlíku. Vlastní toleranci podporuje tak, že donutí transkripci řady TSA (tissue specific antigens) v brzlíku. V nepřítomnosti tohoto regulátoru se medulární TEC projevují jen na omezeně, což způsobuje závažná autoimunitní onemocnění. Při transplantaci role Aire zatím nebyla definována (Gardner et al., 2009).

2.2 Periferní imunologická tolerance

Po pozitivní a negativní selekci se zralé T buňky uvolní z thymu do periferní cirkulace a sekundárních lymfatických orgánů. Negativní výběr v brzlíku odstraní thymocyty, které mají vysokou afinitu k TCR tvořící MHC komplexy. Periferní tolerance je rozhodující pro řízení zralých T buněk s nízkou či střední afinitou TCR na MHC (Mueller, 2010).

2.2.1 Klonální delece

Různé úrovně antigenních stimulací zralých T buněk v periférii může vést ke klonální delecii. Malé množství stimulace může indukovat toleranci T buněk částečnou regulací TCR na CD8⁺ buňky (Ferber et al., 1994). Je však zapotřebí apoptóza T buněk pro indukci periferní tolerance transplantátu. Ke klonální delecii autoreaktivních T buněk dochází prostřednictvím apoptózy prostřednictvím aktivace Fas/FasL dráhy a Bim závislé mitochondriální dráhy 3. Tkáňově spojené antigeny mohou být příčně prezentovány z APC na CD8⁺, které vytváří potenciál pro vývoj autoimunity. Také mohou vést k odstranění autoreaktivních CD8⁺ T buněk (Heath et al., 1998). Davey a kol. prokázal, že tolerance může být udržována vypuštěním aktivovaných CD8⁺ prostřednictvím aktivace Bim, což vede k BCL-2 a inhibici apoptózy T lymfocytů (Davey et al., 2002). Deficient Bim a Fas myši naznačují chybnou indukci periferní tolerance, což vede k zvýšení velikosti lymfatických uzlin, sleziny a rozvoj autoimunity. To tedy dokazuje, že obě molekuly hrají roli v periferní toleranci T buněk (Weant et al., 2008)

2.2.2 Klonální anergie

Aktivace T buněk vyžaduje dva signály: TCR signál a ko-stimulační signál. T buňky nejsou schopny bez ko-stimulačního signálu imunitní odpovědi. Hlavním ko-stimulačním receptorem je CD28 s dvěma ligandy B7.1 (CD80) a B7.2 (CD86), které jsou exprimovány na APC. CD28 jsou signály rozhodující pro aktivaci T buněk, proliferaci a přežívání po interakci s T buňkami APC (Jenkins et al., 1991). Výsledkem aktivace CD28 ve zvýšené expresi cyklinů a cyklin dependentních kináz je snížená regulace inhibitoru CDK cdk27kip1, zvýšená regulace glukózy v PI3K a aktivace Akt (Appleman et al., 2000). CD28 kontroluje přežívání T buněk díky zvýšení BCL_{XL} expresi v T buňkách, kde zabraňuje T- buněčné smrti z apoptických signálů jako je Fas aktivace nebo odstraněním IL-2 (Boise et al., 1995). Aktivace T buněk v nepřítomnosti CD28 vede k anergickému stavu s vadnou aktivací fosfolipázy a intercelulární mobilizací vápníku, která je spojena se zvýšenými hladinami CDK inhibitoru p27Kip1 (Rowell et al., 2005).

2.2.3 Klonální ignorace

Slabé autoreaktivní B buňky, kterým se nepodaří vyvolat delecii, anergii nebo se diferencovat do folikulární nebo marginální zóny B buněk mají potenciál být považovány za nebezpečné v případě, že je povoleno přijímat pomoc od T buněk a podstoupit somatickou mutaci. Zdá se důležité, aby slabé B buňky byly řízeny inhibiční signalizací a byly udržovány ve stavu klonální ignorace za účelem ochrany proti rozvoji autoimunity. V případě slabé autoreaktivní B buňky by se měl fyzicky zapojit vlastní antigen s cizím antigenem do komplexu. Tato aktivace B buněk by mohla usnadnit proces endocytózy, indukci exprese CCR7 a řízení migrace B buněk směřující k T buněčné zóně, kde by mohly cizí peptidy aktivovat CD4+ T buňky. To by mohlo mít za následek TB spolupráci, což by způsobilo somatické mutace buď v mimo folikulárních místech nebo v zárodečném centru, kde by to mohlo vést k tvorbě silných autoreaktivních B buněk a autoprotilátek (Chan et al., 1997; Nishizumi et al., 1995).

2.2.4 Suprese

Důležitou roli v supresi imunitních reakcí hrají regulační T buňky (Treg). Další imunologicky aktivní buňky, které mohou také potlačit imunitní odpověď, jsou NK buňky, CD4-CD8-, CD8+ CD28+ buňky a veto buňky.

Regulační T buňky byly nejdříve definovány u hlodavců jako CD4+ CD25+ s funkcí potlačování imunologické odpovědi (Sakaguchi et al., 1995). Asi 10% z periferních CD4+ buněk exprimují IL-2 receptory na svém povrchu. Za normálních okolností produkuje brzlík imunoregulační CD4+ CD25+ T buňky, které jsou anergické k TCR a jsou schopny potlačit proliferaci jiných T buněk (Itoh et al., 1999). Mohou mít afinitu k MHC/peptid, což vede k úniku z negativní selekce v brzlíku (O'Garra and Vieira, 2004). Vyčerpáním CD25+ T buněk vede k rychlejšímu odmítnutí alogenních štěpů a zvyšuje reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) vztahující se na úmrtnost v myších modelech. Infuze CD4+ CD25+ T regulačních buněk snížila GVHD mortalitu u příjemců alogenní HSTC (Taylor et al., 2002). Treg navozují toleranci k histokompatibilnímu antigenu, který se neshoduje se štěpem a je zapojen v toleranci a prevenci odmítnutí štěpu po transplantaci orgánu (Waldmann et al., 2004).

NK buňky jsou buňky, které exprimují markery NK buněk (CD16 a CD56 u lidí) asociující spolu s markery T buněk a TCR $\alpha\beta$ na jejich povrchu. Vylučují vysoké hladiny IL-4 a IFN- γ (Bendelac et al., 1997).

Aktivita veto buněk je definována jako schopnost potlačení cytotoxických T lymfocytů. Nejúčinnější veto aktivita byla nalezena v CD8+ nebo jejich klonů. K apoptóze dochází přes

Fas/FasL dráhu a všechny buňky včetně BM podskupiny mají tuto aktivitu (Reich-Zeliger et al., 2000). Použitím vysokých dávek kmenových buněk může být indukována tolerance, zejména CD34+, které byly použity v haploidentických transplantacích, což mělo za následek zhojení MHC nesourodých kmenových buněk (Reisner and Martelli, 2008).

3 Buňky a cytokiny účastníci se navození imunologické tolerance

3.1 T regulační buňky

T regulační lymfocyty (Treg) mají klíčovou roli v regulaci celého imunitního systému. Jsou tvořeny v thymu a v menší míře i v periférii. Treg mimo to, že poskytují imunitní dohled a regulaci škodlivých autoimunitních klonů, dokáže potlačit zánětlivé imunitní reakce a regulovat různé buňky a složky imunitního systému. Treg buňky jsou definovány jako CD4⁺CD25^{high} Foxp3 T buněčné populace (Fontenot et al., 2003). CD4 molekula je jeden z markeru T pomocných buněk, které se podílejí na ko - receptoru TCR. Molekula CD25 má úlohu při funkci, přežití a generaci Treg buněk, protože α řetězec má vysokou trimerní afinitu s IL-2 receptorovým komplexem, který je schopen vázat IL-2 i při velmi nízkých koncentracích přítomných v těle (Wang et al., 2005). Transkripční faktor Foxp3, který je také známý jako Scurfin je zásadní pro rozvoj a supresivní funkce Treg buněk (Khattari et al., 2003). Působí jako hlavní regulátor aktivující nebo potlačující cílové geny (Zheng et al., 2007). Původním předpokladem bylo, že Foxp3 definuje nezralé thymocyty a podstupuje diferenciaci do buněk Treg. Studie však ukázaly, že Treg buněčná linie je před indukcí exprese Foxp3 (Lin et al., 2007). Také se prokázalo, že Foxp3 není striktně specifickým markerem pro Treg buňky, může být přechodně exprimován i u jiných leukocytů (Allan et al., 2007). Foxp3 je nezbytný pro získání supresivního fenotypu, amplifikace a stabilizace molekulární struktury (Lin et al., 2007) Treg buněčné linie spolu s dalšími signály jako je IL-2, TCR, a TGF- β . Dysfunkce nebo mutace Foxp3 nebo jeho genu vede k defektnímu vývoji Treg buněk, následkem je těžká imunopatologie, která je vyznačována multiorgánovou autoimunitní a zánětlivou poruchou (Fontenot et al., 2003). Exprese Foxp3 je sama upravována dle počtu transkripčních faktorů stejně jako TCR signalizaci, cytokiny a epigenetické mechanismy (Hori, 2011) – zejména methylace Foxp3 lokusu, která je zásadní pro stabilní udržování Foxp3 exprese (Zheng et al., 2007) a tím je také dána stabilita Treg buněčné linie. Kromě výše uvedených molekul existují jiné povrchové, intracelulární molekuly spojené s Treg buněčným fenotypem. V poslední době studie ukázaly, že transkripční faktor Helios je dalším markerem thymu odvozený od nTreg buněk. Bylo popsáno, že Helios váže Foxp3 promotor, což vede k domněnce, že by mohl být zapojen do regulace Foxp3 exprese (Getnet 2010), tedy supresivní aktivity Treg buněk. Kostimulační molekuly a několik dalších molekul nacházející se na povrchu buněk Treg patří mezi zapojené do vývoje Treg buněk. Nicméně jejich exprese není omezena pouze na podskupinu Treg, ale dají se nalézt i na T a B buňkách.

3.2 B regulační buňky

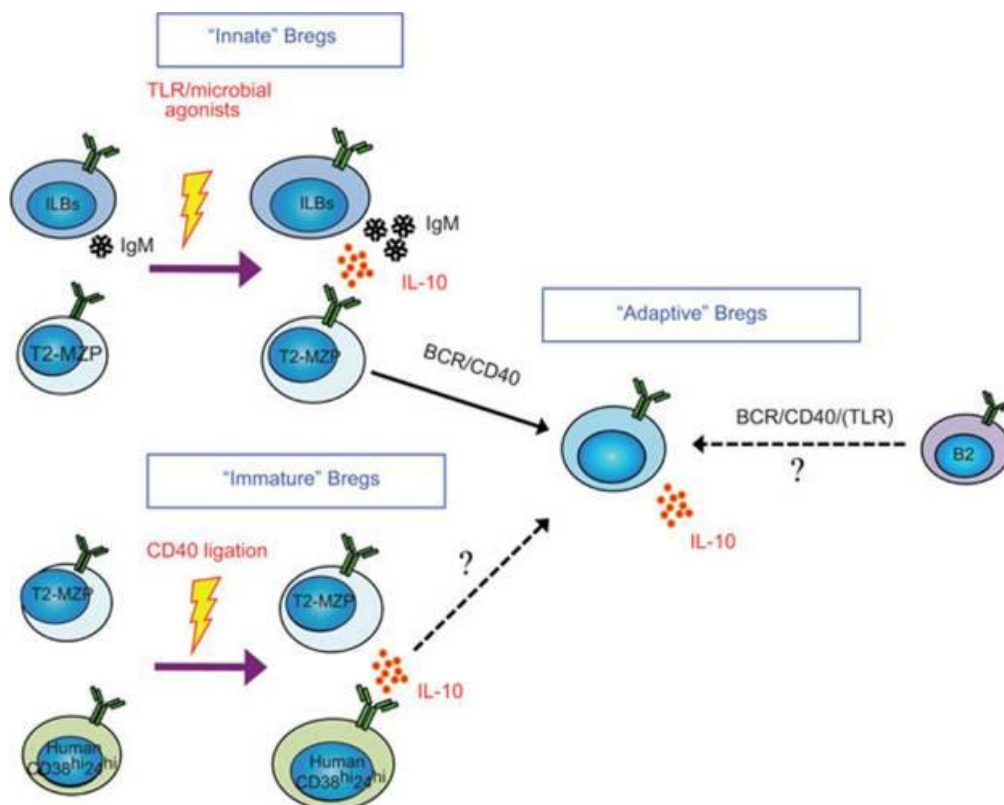
B regulační buňky mají stále neurčitý původ a vývojovou dráhu. Není jasné, zda je možný vývoj B regulačních buněk z různých populací B buněk či existuje jeden specifický progenitor. Bregs jsou tedy definovány na základě jejich funkce, především na schopnosti produkovat supresivní cytokin IL-10. Občas je tato skupina buněk označována jako B10 buňky či Br1 buňky. Stejně tak umí produkovat protizánětlivý cytokin TGF- β , kdy je pak možno B buňky pojmenovat jako Br3 (Berthelot et al., 2013). Obdobně jako u Tregs jsou aktivovány před projevem své funkce. Rovněž je možné, že Bregs mohou exprimovat transkripční faktor Foxp3 označující se jako B-Foxp3 (DiLillo et al., 2010). V současné době neexistuje jednotný model, který by mohl zahrnovat všechny typy Bregs. S přihlédnutím na vlastnosti a jejich původ jde tedy Bregs zařadit do tří hlavních kategorií. První kategorií jsou adaptivní Bregs, které jsou tvořeny pomocí adaptivních imunologických reakcí skrz BCR, CD40 a případně TLR signalizaci (Fillatreau et al., 2002). Další kategorií jsou nezralé Bregs, které jsou vyvinuty z nezralých B buněk pod režii CD40 (Blair et al., 2009). V neposlední řadě vrozené Bregs, které jsou odvozeny od ILBs (O'Garra et al., 1992). Početné studie prokázaly, že lidské B buňky jsou schopny produkovat IL-10 po stimulaci. S odkazem na předešlé kategorie jsou u lidí přítomny nezralé a vrozené druhy. Adaptivní typ by však mohl u lidí také existovat, ale nejsou k tomu v současné době vědecké důkazy (Duddy et al., 2007).

3.2.1 Nezralé lidské Bregs

Po transplantaci ledvin u tolerantních pacientů nedošlo k zvýšení počtu IL-10 k produkci nezralých Bregs v porovnání s pacienty, kteří vyžadují imunosupresivní režim (Duddy et al., 2007). U pacientů, kteří jsou infikováni virem chronické hepatitidy B je rovněž zvýšená produkce IL-10. A to tak, že Bregs potlačí specifickou CD8⁺ T buněčnou odpověď proti viru hepatitidy B (Das et al., 2012).

3.2.2 Vrozené lidské Bregs

Na rozdíl od myších B buněk, které exprimují většinu TLR, lidské B buňky mají omezenější expresní profil TLR. Lidské periferní B buňky jsou především vyjádřené TLR7 a TLR9. Vyšší exprese TLR byly nalezeny v CD27⁺ paměťových B buňkách (Bernasconi et al., 2003). Zatímco aktivace TLR je prvotní hnací silou IL-10 v buňkách lidského těla, kostimulace prostřednictvím BCR82 nebo CD40 by mohla poskytnout synergický účinek pro sekvenci IL-10 v CD27⁺ Bregs (Iwata et al., 2011).



Obrázek 1.: Klasifikace Bregs a jejich vývojové cesty (Zhang, 2013)

3.3 M2 makrofágy

M2 makrofágy neboli alternativně aktivované makrofágy se dají dle své funkce rozdělit do tří skupin a to na makrofágy účastníci se hojení, regulační makrofágy a s tumorem asociované makrofágy (Mosser 2008).

3.3.1 Makrofágy účastníci se hojení

Tyto makrofágy se vyznačují především svými protizánětlivými znaky. Jsou typicky spojeny s Th2 odpovědí a obnovou tkáně, kde je zvýšený předpoklad fibrózy profibrotickými faktory jako je fibronectin, matrixové metaloproteinázy (MMP), IL-1 β a TGF- β (Martinez et al., 2009). Také se zvyšuje exprese arginázy 1, enzymu hydrolyzující L-ornitin a L-arginin na močovinu. Z makrofágů uvolňující se IL-10 a TGF- β inhibují LPS/TLR4 zprostředkovanou produkci TNF- α a IL-1 β a snižují expresi Th1 zvýšením CD4⁺ Foxp3⁺ Treg (Bogdan et al., 1992). Tyto M2 makrofágy jsou charakterizovány tím, že produkují spíše ARG1 než iNOS/NO, což je dělá velice efektivní při odstraňování parazitárních infekcí, ale naopak omezuje schopnost zabít intracelulární patogeny (Hesse et al., 2001). Těž zvyšují expresi manózoového

receptoru, který je schopen vazby na mikroorganismus, který má na sobě vázanou manózu (Anthony et al., 2006).

3.3.2 Regulační makrofágy

Tyto makrofágy jsou buňky s protizánětlivým fenotypem produkující ve velkém množství TGF- β a IL-10. Díky produkci IL-10 jsou schopny diferenciovat Th2 buňky a umožnit regulační T buněčnou odpověď. Exprimují vysokou hladinu kostimulačních molekul (CD80, CD86) (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009). Sfingokináza 1 a LIGHT patří mezi hlavní znaky pro identifikaci regulačních makrofágů (Edwards et al., 2006).

3.3.3 Tumorem asociované makrofágy (TAM)

Tumor asociované makrofágy jsou odvozeny od cirkulujících monocytů, zasahující nádorovou tkáň a svými imunosupresivními vlastnostmi přispívají k růstu nádorů. Mezi faktory podporující růst a migraci nádoru patří vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), CSF a mnoho chemokinů jako je například CCL2 nebo CCL5 (Barleon et al., 1996). Diferenciaci v nádoru zapříčiní TGF- β a IL-10, které jsou produkovány TAM, ale i nádorovými buňkami. Tumorem asociované makrofágy jsou schopny zachytit buněčné drti po poškození tkáně, jsou důležité v lymfogenezi, angiogenezi, přestavbě tkání a funkcí, které podporují vývoj metastáz a nádorů (Mantovani et al., 2002).

4 Navození transplantační tolerance v experimentu

4.1 Antigeny alogenního původu

Osvědčená metoda stanovení tolerance je chimérismus, charakterizující se jako koexistence tkání dvou geneticky různých bytostí v jednom organismu (Billingham, 1952). Může být způsoben infuzí krvetvorných látek či jako vedlejší produkt transplantátu. Jako řešení problému s toxicitou imunosupresiv byly provedeny četné pokusy pro toleranci štěpu v experimentálních modelech. Bylo zjištěno, že smíšený alogenní chimérismus ovlivní přijetí štěpu (Xu et al., 2006). Výhodou vyvolání smíšeného chimérismu je snížení výskytu a závažnosti GVHD.

Při hladině chimerismu dárce >60% nebyl štěp odmítnut po celou dobu studie (100-200 dní), naopak při hladině <20% byl štěp odmítnut. Problém, kterým je potřeba se zabývat v klinické praxi je GVHD (Gorantla et al., 2003). Dalším problémem, který souvisí s chimérismem je toxicita záření. Metodou jak snížit záření je vytvoření vrstvy lymfocytů a CD28 blokády. V experimentech bylo přijetí štěpů touto alternativní cestou bez problémů (Foster et al., 2003).

Myší modely poskytují mnoho výhod studování v laboratoři. Jsou dostupné transgenní kmeny, monoklonální protilátky, produkty cytokinů a další (Foster and Liu, 2003). Využití primátů ve výzkumu začalo v roce 2005, kdy byl transplantovaný štěp odmítnut (Cendales et al., 2005).

4.2 Ozáření

Mezi jedny z nejčastějších popisovaných metod patří metoda založená na myeloablativní přípravě příjemce celotělovým ozářením, avšak tyto jedinci jsou vystaveni vysokému riziku úmrtnosti (Slavin et al., 1998). Po transplantaci se také projevuje do jisté míry imunodeficitní stav (Ildstad, 1985).

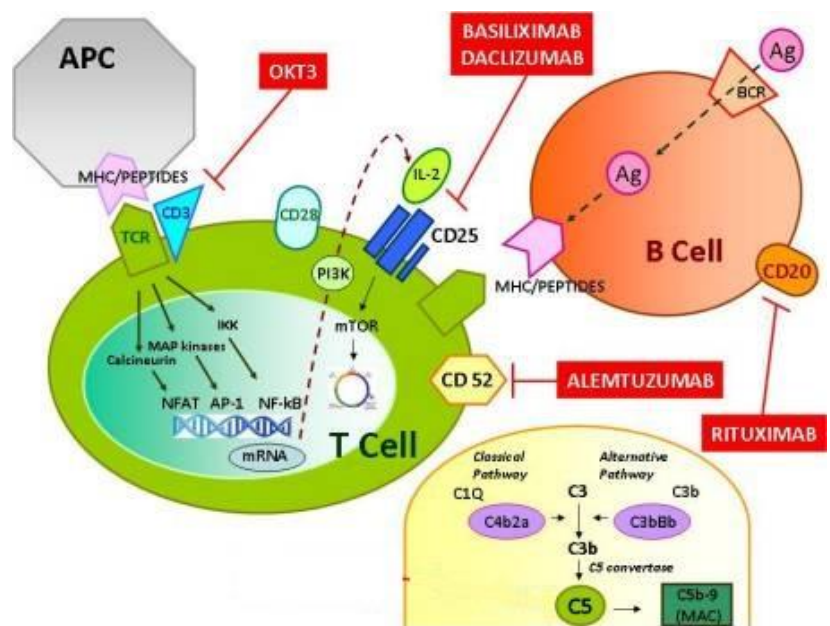
5 Klinické studie k indukci transplantační tolerance

5.1 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky (rpAb) jsou extrahovány ze zvířat, které byly naočkovány lidskými lymfocyty. V současné době jsou dva typy, které jsou použitelné v klinické praxi a to koňský anti-tymocyt globulin (ATG) a králičí ATG. Tyto protilátky modulují expresi buněčných povrchových receptorů a to tak, že činí T buňky inertní (Haurum and Bregenholt, 2005).

5.2 Monoklonální protilátky

Mnoho monoklonálních protilátek (mAb) jsou běžně používáno při transplantaci jako indukční terapie – období před a po transplantaci štěpu. Využívají se také k léčbě akutního odmítnutí štěpu a snížení výskytu následků opožděné funkce štěpu. Většina z těchto léků je zaměřena proti specifickým CD proteinům na T či B buňkách (např. CD3, CD25, CD52).



Obrázek 2.: Monoklonální protilátky (Zaza et al., 2014)

5.2.1 Muromonab

Muromonab-CD3 (OKT3) je první monoklonální protilátka schválena pro léčbu akutního odmítnutí štěpu. Váže se na podjednotku CD3 tvořící vnitřní část receptoru T lymfocytů. Po podání muromonabu jsou CD3+ buňky zlikvidovány a dochází k redukci buněk nesoucí CD4, CD8 a CD11. Hlavní nevýhodou OKT3 je sklon k syndromu uvolňování cytokinů. Tento syndrom je problematický u plicních transplantací, kde byl štěp poškozen ischemií. OKT3 je rozpoznán jako cizí látka u imunitního systému a může to vést k tvorbě neutralizačních protilátek, které mohou způsobit sérovou nemoc (Norman, 1995).

5.2.2 Basiliximab, daklizumab

Basiliximab je chimérická protilátka obsahující 75% lidských komponentů, daklizumab až 90% a je tedy označována jako humanizovaná protilátka. Tyto protilátky jsou namířeny proti alfa řetězci receptoru IL-2 (CD25) a je použity v kombinaci indukujících imunosupresiv (Kahan

et al., 1999). Basiliximab tvoří vazbu blokující interakci IL-2 s IL-2R α . Tento receptor je exprimován pouze na aktivovaných T lymfocytech (Du et al., 2010).

5.2.3 Alemtuzumab

Alemtuzumab je rekombinantní humanizovaná IgG1 protilátka proti antigenu CD52. Rozdíly v expresi CD52 může vysvětlovat diferenciální citlivost na alemtuzumab. Vyčerpává B a T buňky s omezeným či žádným účinkem na hematopoetické progenitorové buňky (Gilleece and Dexter, 1993). Paměťové T buňky jsou částečně ušetřeny alemtuzumabem, kde se CD8⁺ buňky obnovují rychleji než CD4⁺ buňky (Trzonkowski et al., 2008). Také odstraňuje dendritické buňky odvozené z monocytů z krevního oběhu, což snižuje fagocytózu a prezentaci hostitelského antigenu. Toto pravděpodobně přispívá ke snížení GvHD (Ratzinger et al., 2003).

5.2.4 Rituximab

Rituximab je monoklonální protilátka proti CD20 vyskytující se na B buňkách. Po vazbě rituximabu na CD20 dochází k cytolýze B buněk a k jejich obnovení dochází až za 6 měsíců. Mechanismus účinku při akutní humorální rejekci není jasný, vzhledem k tomu, že plazmatické buňky neexprimují na svém povrchu CD20. Většina studií však hlásí příznivé výsledky. Také může být použit k desenzibilizaci imunizovaných pacientů, kteří kvůli pozitivním výsledkům křížové zkoušky nemohou podstoupit transplantaci. Nicméně se často stává, že titer neklesne na potřebnou hodnotu (Vo et al., 2008).

5.2.5 Belatacept

Belatacept je fúzní protein CTLA-4, který na svůj povrch váže komplex CD80/86. Belatacept je odvozen z abataceptu, což je lidský fúzní protein kombinující CTLA-4 s IgG1. Liší se od sebe substitucí dvou specifických aminokyselin, které způsobují vyšší aviditu vázání k CD80 a CD86 a účinnější inhibici aktivace T buněk. Belatacept dokáže zachovat rychlost glomerulární filtrace a také snížit chronickou nefropatii štěpu (Vincenti et al., 2005).

5.2.6 Intravenózní imunoglobuliny

Intravenózní imunoglobuliny (IVIG) jsou nejběžnějším prostředkem využívajícím se samostatně, či častěji v kombinovaných formách u pacientů před transplantací s pozitivní dárcovskou specifickou anti-HLA protilátkou (DSA) a k léčbě po transplantaci v případě akutní humorální rejekce. Nízké dávky IVIG se tedy dají podávat v kombinaci s plazmaferézou, takrolimem a mykofenolátem mofetilem (MMF). Jako vedlejší účinky se může objevit anafylaktická reakce na podání cizorodé bílkoviny nebo trombotické komplikace. Je nutné při léčbě sledovat DSA (Scornik et al., 2007).

5.2.7 Bortezomib

Bortezomib je inhibitorem proteazomu. Proteazom je proteinový komplex odbourávající ubikvitinované proteiny, které jsou přítomny jak v cytoplazmě, tak v jádru. Inhibice proteazomu může vést ke snížení aktivity transkripčního faktoru NF κ B, zástavě buněčného cyklu či zvýšit apoptózu (Sadaka et al., 2011). Díky svému cytotoxickému účinku na plazmatické buňky, které nemusí být zničeny jinou imunosupresivní léčbou, se využívá v transplantologii při léčení akutní protilátkami zprostředkované rejekce. Po podání bortezomibu dochází k trvalé a rychlé eliminaci dárcovských specifických anti-HLA protilátek. Mezi vedlejší účinky patří např. neuropatie a hematologická toxicita, které je potřeba pečlivě sledovat (Walsh et al., 2010).

6 Perspektivní cíle imunomodulace vedoucí k navození transplantační tolerance

Jednou z největších překážek při transplantaci je imunitní odpověď, závisící na síle a typu reakce, která je určena typem buňky a buněčnými podmínkami, ve kterých se vyskytuje. Vnitřní (hormony, cytokiny) a vnější (chemické látky, infekce) podmínky mohou změnit epigenetický profil genu, a tím přímo ovlivnit jeho expresi a nakonec i imunitní odpověď. Znalost epigenetických mechanismů, které se podílejí na diferenciaci a rozvoji imunitního systému v posledních letech pokročila. Sledování těchto mechanismů ukazuje, že by se mohly snížit nepříznivé účinky imunosupresivní terapie (Rodriguez-Cortez et al., 2011). Působením několika enzymů jako je DNA methyltransferázy (DNMT), histondeacetylázy (HDAC), histonmethyltransferázy (HMT), histonacetyltransferázy (čepička) a fosfatázy jsou způsobeny epigenetické změny, které mají schopnost narušit buněčný mechanismus přispívající ke změnám imunitní buněčné homeostázy (ENCODE Project Consortium, 2012).

V současné době je nedostatek biomarkerů, které jsou potřebné pro sledování imunitní odpovědi. Jsou nutné pro snížení imunosupresivní terapie a zlepšení z dlouhodobého hlediska výsledků transplantací. Vyvinutím neinvazivních biomarkerů by došlo k včasné detekci pacientů, kteří odmítnou transplantovaný štěp. Methylace DNA na IFN γ , FasL a IL-10 genech by mohly být použity jako biomarkery pro snížení odmítnutí štěpu. Současné studie ukazují, že léčba s epigenetickými modifikátory v kombinaci s imunosupresivní terapií prodlužuje přežívání štěpů.

V posledních letech se zdá být jako atraktivní strategie buněčné terapie využití mezenchymálních kmenových buněk (MSCS), které se získávají z kostní dřeně. Mají imunomodulační vlastnosti, podporují růst T regulačních lymfocytů a tlumí odpověď T efektorových buněk (Wang et al., 2013).

Při použití epigenetických modifikací však také existuje riziko způsobení chromozomální nestability, což může vyvolat rakovinu. Je tedy potřeba zaměřit se na proteiny, které rozeznají specifické modifikace histonů jako je například BET rodina proteinů, které umožní dědičnou a stabilní manipulaci genové exprese cílových genů (Nicodeme et al., 2010).

6.1 Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) jsou esenciálními mediátory adaptivní a přirozené imunitní odpovědi vyvolávající toleranci (Merad et al., 2007). Přímo po transplantaci vedou k aktivaci efektorových T lymfocytů a NK buněk či organizují zánět po ischemicko-reperfučním poškození (Bullwinkel et al., 2011). Při absenci zánětlivých signálů dendritické buňky mohou indukovat toleranci. Terapie s tolerogenními DC (TolDC) je s v současnosti přitažlivým přístupem k minimalizaci využívání imunosupresiv (Moreau et al., 2012). Ve zvířecích modelech došlo ke zlepšení funkce štěpu a v současné době je cílem toto převést na lidi. Na funkce DC mohou mít vliv epigenetické modifikátory např. HDAC (Frikeche et al., 2012). Společně s butyrátem a valproátem může dojít ke snížení sekrece protizánětlivých cytokinů (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL12) a exprese kostimulačních molekul (CD40, CD80, CD86) (Nencioni et al., 2007).

6.2 Chimerismus

Nedávno bylo uvedeno, že trvalý chimerismus je nezbytným předpokladem pro úspěšnou indukci tolerance. Avšak dle jiných výzkumů nahrazení celé příjemcovy hematopoetické populace dárcovskými buňkami je obtížné u pacientů bez malignit navodit. Mimo problémy s GVHD může trvalý chimérismus vést k sekundární imunodeficienci a náchylnosti k bakteriálním, virovým či plísňovým infekcím (Leventhal et al., 2012). A i když se při smíšenému chimerismu podaří těmto komplikacím zamezit, tento stav je obtížné udržet u neshodujících se MHC, kde má smíšený chimérismus tendenci být buď přechodně (buňky příjemce nahradí donorové buňky) nebo trvale (dárcovské jsou nahrazeny příjemcovými) potlačen.

Výsledky studií, u kterých byla u hematologických malignit kromě kostní dřeně transplantovaná také ledvina, též poškozena amyloidózou ukázaly, že lze u těchto pacientů minimalizovat dávky imunosupresiv a někteří dokonce přežívají více než 10 let ve stavu smíšeného chimerismu bez jakékoliv imunosuprese (Kawai et al., 2014).

Závěr

Závěrem celé práce lze říci, že v současné době zaznamenává transplantační imunologie zásadní pokrok. Pokud by se podařilo dosáhnout podobných výsledků u člověka jako na zvířecích modelech, znamenalo by to obrovský posun v transplantační medicíně.

Momentálně se potlačení imunitní odpovědi proti štěpu navozuje pomocí farmakologických imunosupresiv. Bohužel je toto řešení velmi nákladné a je také spojeno se závažnými nežádoucími účinky. Výsledky nejnovějších studií však ukazují, že dlouhodobé stability transplantované ledviny bez další imunosupresivní léčby je u některých pacientů možno dosáhnout např. indukci smíšeného chimerismu.

Současný trend ukazuje, že v nejbližších letech bude klíčové najít další biomarkery, které by vymezily vhodné pacienty, u kterých bude možno snížit nebo dokonce vysadit imunosupresi aniž by došlo k rejekci alotransplantátu. Naděje se vkládají také do využití mezenchymálních kmenových buněk, T regulačních buněk a dalších populací, které mají imunomodulační schopnosti a mohly by přispět k toleranci štěpu.

Seznam zkratek

APC	Antigen presenting cell	Buňka prezentující antigen
ARG	Arginine	Arginin
ATG	Antithymocyte globuline	Antithymocytární globulin
BCL	B cell lymphoma	B lymfocytární lymfom
BCR	B cell receptor	B buněčný receptor
Breg	B regulatory cells	B regulační lymfocyty
CCL	Chemokine ligands	Chemokinový ligand
CCR	Chemokine receptor	Chemokinový receptor
CD	Cluster of differentiation	Diferenční antigen
CDC	Complement dependent cytotoxicity assay	Komplemet-dependentní cytotoxický test
Cdk	Cyclin-dependent kinase	Cyklin-dependentní kináza
CSF	Colony stimulating factors	Faktory stimulující kolonie
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	Cytotoxický T lymfocyt
DC	Dendritic cell	Dendritická buňka
DNMT	DNA methyltransferase	DNA methyltransferáza
DP	Double positive	
DSA	Donor specific antibodies	Donor-specifické protilátky
Fas	Surface molecule	Povrchová molekula
FasL	Fas ligand	Fas ligand
Foxp3	Scurfin	Scurfin
GVHD	Graft versus host disease	Reakce štěpu proti hostiteli
HDAC	Histone deacetylase	Histondeacetyláza
HLA	Human leukocyte antigen	Lidské leukocytární antigeny
HMT	Histone methyl transferase	Histonmethyltransferáz
HSTC	Hematopoietic stem cells	Hematopoietické kmenové buňky

IFN	Interferon	Interferon
IgG	Immunoglobulin G	Imunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M	Imunoglobulin M
IL	Interleukin	Interleukin
ILB	Innate like B cell	Vrozená jako B buňka
iNOS	Inducible NOS	Indukovatelná NOS
IVIG	Globuline intravenous	Intravenózní globulin
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysacharid
mAB	Monoclonal antibody	Monoklonální protilátky
MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex
MMF	Mycophenolate mofetil	Mykofenolát mofetil
MMP	Matrix metalloproteinase	Matrixové metaloproteinázy
MSCS	Mesenchymal stem cells	Mezenchymální kmenové buňky
NF κ B	Transcription factor	Transkripční faktor
NK	Natural killer	Přirození zabíječi
NOS	Nitric oxide synthase	Syntáza oxidu dusnatého
OKT3	Muromonab	Muromonab
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase	Fosfoinositid-3-kináza
rpAb	Polyclonal antibody	Polyklonální protilátky
TAM	Tumor associated macrophages	Tumorem asociované makrofágy
TCR	T cell receptor	T buněčný receptor
TEC	Thymic epithelial cells	Epitelové buňky thymu
TGF	Transforming growth factor	Transformující růstový faktor
Th	Helper T lymphocyte	Pomocný T lymfocyt
TLR	Toll-like receptor	Receptor podobný genu Toll
TNF	Tumour necrosis factor	Faktor nekrotizující nádory
ToIDC	Tolerogenic dendritic cells	Tolerogenní dendritické buňky

Treg	T regulatory cells	T regulační lymfocyty
TSA	Tissue specific antigens	Tkáňově specifické antigeny
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Vaskulární endoteliální růstový faktor

Seznam literatury

* - sekundární zdroj citací

- Afzali, B., Lechler, R.I., and Hernandez-Fuentes, M.P. (2007). Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens* 69, 545–556.
- Allan, S.E., Crome, S.Q., Crellin, N.K., Passerini, L., Steiner, T.S., Bacchetta, R., Roncarolo, M.G., and Levings, M.K. (2007). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 19, 345–354.
- Anthony, R.M., Urban, J.F., Alem, F., Hamed, H.A., Rozo, C.T., Boucher, J.-L., Van Rooijen, N., and Gause, W.C. (2006). Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* 12, 955–960.
- Appleman, L.J., Berezovskaya, A., Grass, I., and Boussiotis, V.A. (2000). CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J. Immunol.* 164, 144–151.
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., and Marmé, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87, 3336–3343.
- Barton, G.M., and Rudensky, A.Y. (1999). Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells. *Science* 283, 67–70.
- Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H., and Roark, J.H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 535–562.
- Bernasconi, N.L., Onai, N., and Lanzavecchia, A. (2003). A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 101, 4500–4504.
- Berthelot, J.-M., Jamin, C., Amrouche, K., Le Goff, B., Maugars, Y., and Youinou, P. (2013). Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine* 80, 18–22.
- Billingham (1952). Tolerance to homografts, twin diagnosis, and the freemartin condition in cattle. *Heredity* 6, 201–212.
- Blair, P.A., Chavez-Rueda, K.A., Evans, J.G., Shlomchik, M.J., Eddaoudi, A., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2009). Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 182, 3492–3502.
- Bogdan, C., Paik, J., Vodovotz, Y., and Nathan, C. (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J. Biol. Chem.* 267, 23301–23308.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87–98.

- Buhlmann, J.E., Elkin, S.K., and Sharpe, A.H. (2003). A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J. Immunol.* *170*, 5421–5428.
- Bullwinkel, J., Lüdemann, A., Debarry, J., and Singh, P.B. (2011). Epigenotype switching at the CD14 and CD209 genes during differentiation of human monocytes to dendritic cells. *Epigenetics* *6*, 45–51.
- Cendales, L.C., Xu, H., Bacher, J., Eckhaus, M.A., Kleiner, D.E., and Kirk, A.D. (2005). Composite tissue allotransplantation: development of a preclinical model in nonhuman primates. *Transplantation* *80*, 1447–1454.
- Chan, V.W., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A.L., and Lowell, C.A. (1997). Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* *7*, 69–81.
- Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A.R., Khanna, P., Peppas, D., Chen, A., Blair, P., Dusheiko, G., Gill, U., et al. (2012). IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J. Immunol.* *189*, 3925–3935.
- Davey, G.M., Kurts, C., Miller, J.F.A.P., Bouillet, P., Strasser, A., Brooks, A.G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2002). Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *J. Exp. Med.* *196*, 947–955.
- Derese Getnet, J.F.G. (2010). A role for the transcription factor Helios in human CD4()CD25() regulatory T cells. *Molecular Immunology* *47*, 1595–1600.
- DiLillo, D.J., Matsushita, T., and Tedder, T.F. (2010). B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1183*, 38–57.
- Du, J., Yang, H., Zhang, D., Wang, J., Guo, H., Peng, B., Guo, Y., and Ding, J. (2010). Structural basis for the blockage of IL-2 signaling by therapeutic antibody basiliximab. *J. Immunol.* *184*, 1361–1368.
- Duddy, M., Niino, M., Adatia, F., Hebert, S., Freedman, M., Atkins, H., Kim, H.J., and Bar-Or, A. (2007). Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol.* *178*, 6092–6099.
- Edwards, J.P., Zhang, X., Frauwirth, K.A., and Mosser, D.M. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* *80*, 1298–1307.
- ENCODE Project Consortium (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* *489*, 57–74.
- Ferber, I., Schönrich, G., Schenkel, J., Mellor, A.L., Hämmerling, G.J., and Arnold, B. (1994). Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* *263*, 674–676.
- Fillatreau, S., Sweeney, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* *3*, 944–950.

- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *4*, 330–336.
- Foster, R.D., and Liu, T. (2003). Orthotopic hindlimb transplantation in the mouse. *J Reconstr Microsurg* *19*, 49–52; discussion 53–54.
- Foster, R.D., Pham, S., Li, S., and Aitouche, A. (2003). Long-term acceptance of composite tissue allografts through mixed chimerism and CD28 blockade. *Transplantation* *76*, 988–994.
- Frikeche, J., Peric, Z., Brissot, E., Grégoire, M., Gaugler, B., and Mohty, M. (2012). Impact of HDAC inhibitors on dendritic cell functions. *Exp. Hematol.* *40*, 783–791.
- Gardner, J.M., Fletcher, A.L., Anderson, M.S., and Turley, S.J. (2009). AIRE in the thymus and beyond. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 582–589.
- Gilleece, M.H., and Dexter, T.M. (1993). Effect of Campath-1H antibody on human hematopoietic progenitors in vitro. *Blood* *82*, 807–812.
- Gorantla, V.S., Prabhune, K.A., Perez-Abadia, G., Ildstad, S.T., Maldonado, C., Orhun, H.I., Majzoub, R.K., Francois, C.G., Kakoulidis, T.P., Brouha, P.C.R., et al. (2003). Composite tissue allotransplantation in chimeric hosts: part I. Prevention of graft-versus-host disease. *Transplantation* *75*, 922–932.
- Griesemer, A.D., Sorenson, E.C., and Hardy, M.A. (2010). The role of the thymus in tolerance. *Transplantation* *90*, 465–474.
- Haurum, J., and Bregenholt, S. (2005). Recombinant polyclonal antibodies: therapeutic antibody technologies come full circle. *IDrugs* *8*, 404–409.
- Heath, W.R., Kurts, C., Miller, J.F., and Carbone, F.R. (1998). Cross-tolerance: a pathway for inducing tolerance to peripheral tissue antigens. *J. Exp. Med.* *187*, 1549–1553.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J., and Wynn, T.A. (2001). Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* *167*, 6533–6544.
- Hori, S. (2011). Stability of regulatory T-cell lineage. *Adv. Immunol.* *112*, 1–24.
- Ildstad (1985). Characterization of mixed allogeneic chimeras. Immunocompetence, in vitro reactivity, and genetic specificity of tolerance. *J Exp Med* *162*, 231–244.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* *162*, 5317–5326.
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* *117*, 530–541.

- Jenkins, M.K., Taylor, P.S., Norton, S.D., and Urdahl, K.B. (1991). CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J. Immunol.* *147*, 2461–2466.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1996). Molecular Mechanisms of Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity and Their Role in Immunological Protection and Pathogenesis in Vivo. *Annual Review of Immunology* *14*, 207–232.
- Kahan, B.D., Rajagopalan, P.R., and Hall, M. (1999). Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2-receptor monoclonal antibody. United States Simulect Renal Study Group. *Transplantation* *67*, 276–284.
- Kawai, T., Sachs, D.H., Sprangers, B., Spitzer, T.R., Saidman, S.L., Zorn, E., Tolkoff-Rubin, N., Preffer, F., Crisalli, K., Gao, B., et al. (2014). Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am. J. Transplant.* *14*, 1599–1611.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S.-A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* *4*, 337–342.
- Kishimoto, H., and Sprent, J. (1999). Strong TCR ligation without costimulation causes rapid onset of Fas-dependent apoptosis of naive murine CD4+ T cells. *J. Immunol.* *163*, 1817–1826.
- Kishimoto, H., Surh, C.D., and Sprent, J. (1998). A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* *187*, 1427–1438.
- Leventhal, J., Abecassis, M., Miller, J., Gallon, L., Ravindra, K., Tollerud, D.J., King, B., Elliott, M.J., Herzig, G., Herzig, R., et al. (2012). Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med* *4*, 124ra28.
- Lin, W., Haribhai, D., Relland, L.M., Truong, N., Carlson, M.R., Williams, C.B., and Chatila, T.A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat. Immunol.* *8*, 359–368.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* *23*, 549–555.
- Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 451–483.
- Martinez, O.M., Ascher, N.L., Ferrell, L., Villanueva, J., Lake, J., Roberts, J.P., and Krams, S.M. (1993). Evidence for a nonclassical pathway of graft rejection involving interleukin 5 and eosinophils. *Transplantation* *55*, 909–918.
- Merad, M., Collin, M., and Bromberg, J. (2007). Dendritic cell homeostasis and trafficking in transplantation. *Trends Immunol.* *28*, 353–359.
- Moreau, A., Varey, E., Bouchet-Delbos, L., and Cuturi, M.-C. (2012). Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. *Transplant Res* *1*, 13.

- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Mueller, D.L. (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 11, 21–27.
- Nencioni, A., Beck, J., Werth, D., Grünebach, F., Patrone, F., Ballestrero, A., and Brossart, P. (2007). Histone deacetylase inhibitors affect dendritic cell differentiation and immunogenicity. *Clin. Cancer Res.* 13, 3933–3941.
- Nicodeme, E., Jeffrey, K.L., Schaefer, U., Beinke, S., Dewell, S., Chung, C.-W., Chandwani, R., Marazzi, I., Wilson, P., Coste, H., et al. (2010). Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic. *Nature* 468, 1119–1123.
- Nishizumi, H., Taniuchi, I., Yamanashi, Y., Kitamura, D., Ilic, D., Mori, S., Watanabe, T., and Yamamoto, T. (1995). Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity* 3, 549–560.
- Norman, D.J. (1995). Mechanisms of action and overview of OKT3. *Ther Drug Monit* 17, 615–620.
- O’Garra, A., and Vieira, P. (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* 10, 801–805.
- O’Garra, A., Chang, R., Go, N., Hastings, R., Haughton, G., and Howard, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* 22, 711–717.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J. Immunol.* 182, 4499–4506.
- Punt, J.A., Osborne, B.A., Takahama, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1994). Negative selection of CD4+CD8+ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J. Exp. Med.* 179, 709–713.
- Racusen, L.C., and Haas, M. (2006). Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clin J Am Soc Nephrol* 1, 415–420.
- Ratzinger, G., Reagan, J.L., Heller, G., Busam, K.J., and Young, J.W. (2003). Differential CD52 expression by distinct myeloid dendritic cell subsets: implications for alemtuzumab activity at the level of antigen presentation in allogeneic graft-host interactions in transplantation. *Blood* 101, 1422–1429.
- Reich-Zeliger, S., Zhao, Y., Krauthgamer, R., Bachar-Lustig, E., and Reisner, Y. (2000). Anti-third party CD8+ CTLs as potent veto cells: coexpression of CD8 and FasL is a prerequisite. *Immunity* 13, 507–515.
- Reisner, Y., and Martelli, M.F. (2008). From “megadose” haploidentical hematopoietic stem cell transplants in acute leukemia to tolerance induction in organ transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.* 40, 1–7.
- Rodriguez-Cortez, V.C., Hernando, H., de la Rica, L., Vento, R., and Ballestar, E. (2011). Epigenomic deregulation in the immune system. *Epigenomics* 3, 697–713.

- Rowell, E.A., Walsh, M.C., and Wells, A.D. (2005). Opposing roles for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in the control of CD4+ T cell proliferation and effector function. *J. Immunol.* *174*, 3359–3368.
- Sadaka, B., Alloway, R.R., and Woodle, E.S. (2011). Clinical and investigational use of proteasome inhibitors for transplant rejection. *Expert Opin. Investig. Drugs* *20*, 1535–1542.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (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*, 1151–1164.
- Schmid, D.S., Tite, J.P., and Ruddle, N.H. (1986). DNA fragmentation: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting helper T-cell clones, and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 1881–1885.
- Scornik, J.C., Guerra, G., Schold, J.D., Srinivas, T.R., Dragun, D., and Meier-Kriesche, H.-U. (2007). Value of posttransplant antibody tests in the evaluation of patients with renal graft dysfunction. *Am. J. Transplant.* *7*, 1808–1814.
- Slavin, S., Nagler, A., Naparstek, E., Kapelushnik, Y., Aker, M., Cividalli, G., Varadi, G., Kirschbaum, M., Ackerstein, A., Samuel, S., et al. (1998). Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* *91*, 756–763.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 139–176.
- Taylor, P.A., Lees, C.J., and Blazar, B.R. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* *99*, 3493–3499.
- Trzonkowski, P., Zilvetti, M., Chapman, S., Wieckiewicz, J., Sutherland, A., Friend, P., and Wood, K.J. (2008). Homeostatic repopulation by CD28-CD8+ T cells in alemtuzumab-depleted kidney transplant recipients treated with reduced immunosuppression. *Am. J. Transplant.* *8*, 338–347.
- Vincenti, F., Larsen, C., Durrbach, A., Wekerle, T., Nashan, B., Blanche, G., Lang, P., Grinyo, J., Halloran, P.F., Solez, K., et al. (2005). Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* *353*, 770–781.
- Vo, A.A., Lukovsky, M., Toyoda, M., Wang, J., Reinsmoen, N.L., Lai, C.-H., Peng, A., Villicana, R., and Jordan, S.C. (2008). Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* *359*, 242–251.
- Waldmann, H., Graca, L., Cobbold, S., Adams, E., Tone, M., and Tone, Y. (2004). Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin. Immunol.* *16*, 119–126.
- Walsh, R.C., Everly, J.J., Brailey, P., Rike, A.H., Arend, L.J., Mogilishetty, G., Govil, A., Roy-Chaudhury, P., Alloway, R.R., and Woodle, E.S. (2010). Proteasome inhibitor-based

- primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection. *Transplantation* 89, 277–284.
- Wang, X., Rickert, M., and Garcia, K.C. (2005). Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science* 310, 1159–1163.
- Wang, Y., Chen, T., Yan, H., Qi, H., Deng, C., Ye, T., Zhou, S., and Li, F.-R. (2013). Role of histone deacetylase inhibitors in the aging of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 114, 2231–2239.
- Weant, A.E., Michalek, R.D., Khan, I.U., Holbrook, B.C., Willingham, M.C., and Grayson, J.M. (2008). Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8+ T cell contraction. *Immunity* 28, 218–230.
- Xu, H., Chilton, P.M., Tanner, M.K., Huang, Y., Schanie, C.L., Dy-Liacco, M., Yan, J., and Ildstad, S.T. (2006). Humoral immunity is the dominant barrier for allogeneic bone marrow engraftment in sensitized recipients. *Blood* 108, 3611–3619.
- Zaza, G., Tomei, P., Granata, S., Boschiero, L., and Lupo, A. (2014). Monoclonal Antibody Therapy and Renal Transplantation: Focus on Adverse Effects. *Toxins (Basel)* 6, 869–891.
- Zhang, X. (2013). Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell Mol Immunol* 10, 113–121.
- Zheng, Y., Josefowicz, S.Z., Kas, A., Chu, T.-T., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936–940.