

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: doktorský

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Eva Krepsová

rozená Kryštůfková

Markery transplantační tolerance po transplantaci ledviny

Markers of transplantation tolerance in kidney transplantation

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

IKEM

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 11. 1. 2016

MUDr. Eva Krepsová

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika nefrologie, IKEM, Praha

Autor: MUDr. Eva Krepsová

Školitel: prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

Identifikační záznam:

KREPSOVÁ, Eva. *Markery transplantační tolerance po transplantaci ledviny [Markers of transplantation tolerance in kidney transplantation]*. Praha, 2016. 93 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika nefrologie, Transplantcentrum, Institut klinické a experimentální medicíny. Školitel prof. MUDr. Ondřej Viklický, CSc.

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	6
ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
SEZNAM ZKRATEK	9
1. ÚVOD.....	11
1.1. Definice tolerance	12
1.2. Definice biomarkeru.....	13
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY.....	14
2.1. Současné možnosti predikce rejekce před transplantací.....	14
2.2. Potransplantační vyšetření.....	17
Biomarkery v krvi.....	18
Biomarkery v biopsii, protokolární biopsie	21
3. HYPOTÉZY A CÍLE	23
Hypotézy	23
Cíle.....	23
4. METODY	24
4.1. Pacienti a vzorky.....	24
4.2. Renální biopsie a léčba rejekce	25
4.3. Průtoková cytometrie mononukleárních buněk periferní krve	25
4.4. <i>In vitro</i> stimulace a měření periferních mononukleárních buněk.....	27
4.5. Analýza genové exprese	28
Izolace RNA.....	28
Kvantitativní RT-PCR analýza.....	28
4.6. Statistická analýza	29

5.	VÝSLEDKY.....	30
5.1.	Vliv indukční imunosuprese na regulační T lymfocyty	30
5.2.	Vliv indukční imunosuprese na expresi genů asociovaných s tolerancí a rejekcí	40
5.3.	Subpopulace monocytů po transplantaci ledviny	53
5.4.	Biomarkery tolerance spojené s funkcí B lymfocytů.....	57
6.	DISKUZE	70
7.	ZÁVĚRY	82
8.	CONCLUSIONS	83
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84
	PUBLIKACE.....	90
	ABSTRAKTA PŘIJATÁ NA KONGRESY A SYMPOZIA	91

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Ondřeji Viklickému, CSc. za jeho několikaleté systematické a vysoce odborné vedení v mém Ph.D. studiu. Dále bych chtěla poděkovat všem spoluautorům za intenzivní práci na našem společném výzkumu a publikacích, jmenovitě RNDr. Aleně Sekerkové, Mgr. Petře Hrubé Ph.D., Ing. Petře Hřibové Ph.D., Ing. Ireně Týcové, Ph.D. a prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc. Také bych chtěla poděkovat všem, kteří odvedli velkou práci při sběru a analýze vzorků, zejména Romaně Poláčkové, Martině Ondrakové, Kataríně Barčíkové, DiS., Evě Fáberové a Adéle Sajdlové. Za cenné rady a spolupráci na statistické analýze děkuji Mgr. Jeleně Skybové a MUDr. Peteru Wohlfahrtovi, Ph.D. Dále děkuji za spolupráci pacientům, kteří se zúčastnili naší studie. Na konec chci z celého srdce poděkovat mé rodině za podporu a lásku, kterou mi dávají. Mé matce MUDr. Olze Kryštůfkové také děkuji za to, že se mnou dělí o své bohaté odborné zkušenosti. Manželovi Davidovi děkuji za velkou trpělivost a za to, jakou je mi oporou.

ABSTRAKT

Pro dlouhodobé přijetí transplantované ledviny je zatím nezbytná dlouhodobá účinná imunosuprese, která však s sebou nese řadu nežádoucích účinků. Naopak, při její nedostatečnosti hrozí rejekce a selhání funkce štěpu. Proto se hledají nové biomarkery, které by odrážely imunologický stav pacienta, a umožnily by tak individualizovat imunosupresivní léčbu. Prokázali jsme, že pacienti po transplantaci ledviny po indukci králičím anti-thymocytárním globulinem (rATG) či basiliximabem měli snížený výskyt akutní rejekce 3 měsíce po transplantaci. Po rATG došlo v periferní krvi příjemců k hluboké depleci T a NK lymfocytů a poklesu exprese genů výhradně exprimovaných těmito buňkami zároveň s výraznou expanzí regulačních T lymfocytů (Treg) v CD4⁺ kompartmentu. Indukce rATG byla dále krátce po transplantaci spojena se zvýšením dvou transkriptů asociovaných s rejekcí (*MAN1A1* a *TLR5*). Po indukci basiliximabem jsme v krvi přechodně detekovali CD4⁺CD25^{low}-FoxP3⁺ populaci současně s vymizením CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg. Absolutní počty CD4⁺FoxP3⁺ Treg po basiliximabu byly přechodně zvýšené a tato léčba byla také spojená s vyšší expresí genů *FOXP3* a *TCAIM*. Dále jsme pozorovali vyšší poměr CD4⁺FoxP3⁺ Treg k CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ efektorovým T lymfocytům v potransplantačním období u pacientů s indukcí basiliximabem, kteří během sledování neprodělali rejekci. Také jsme prokázali, že transplantace ledviny je spojena se změnou počtů CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů, která je částečně ovlivněna použitou imunosupresí. Ukázali jsme, že i u pacientů po transplantaci ledviny léčených standardní imunosupresí, kteří během jednoho sledování neprodělali rejekci, byla zvýšená exprese genů asociovaných s tolerancí spojených s funkcí B lymfocytů. Domníváme se, že nové biomarkery tolerance představují naději pro budoucí potransplantační sledování, ale jejich užitečnost musí být validována v prospektivních klinických studiích.

Klíčová slova: B lymfocyty, basiliximab, biomarker, monocyty, rATG, regulační T lymfocyty, rejekce, tolerance, transplantace ledviny

ABSTRACT

Long-term renal graft acceptance still requires long-term immunosuppressive therapy, which is accompanied by many adverse effects. Contrarily insufficient immunosuppression could lead to graft rejection and its failure. Therefore, research continues for biomarkers that reflect a patient's immunological status and thus allowing for individualized immunosuppressive therapy. In our study we showed lower incidence of acute rejection in kidney transplant recipients treated with rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) or basiliximab induction within the first three months after transplantation. The rATG induction caused profound decrease of recipient's peripheral blood T and NK cells, as well as transcripts that are exclusively expressed by these cell types together with expansion of regulatory T cells (Tregs) among CD4⁺ T cells. In rATG group the increase of two transcripts associated with rejection (*MAN1A1* and *TLR5*) was also observed in early post-transplant period. After the basiliximab induction we transiently detected CD4⁺CD25^{low}-FoxP3⁺ cell population along with disappearance of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs. Basiliximab induction resulted in a transient increase in CD4⁺FoxP3⁺ Tregs, accompanied by the highest peripheral expression levels of markers associated with operational tolerance (*FOXP3* and *TCA1M*). Higher post-transplant CD4⁺FoxP3⁺ Tregs to CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ effector T cells ratios were observed in those basiliximab treated patients who were rejection free during a follow-up. Further, we demonstrated that kidney transplantation is associated with modulation of CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺CD163⁺ monocyte subpopulations partially affected by an immunosuppressive regime used. We showed the up-regulation of several operational tolerance-associated B-cell-related genes also in renal transplant recipients on standard immunosuppression who were rejection-free during one-year follow-up. We assume that new biomarkers of tolerance represent a hope for future post-transplant monitoring, however, their utility need to be validated in prospective clinical trials.

Keywords: B cell, basiliximab, biomarker, kidney transplantation, monocytes, rATG, regulatory T cells, rejection, tolerance

SEZNAM ZKRATEK

ABMR	antibody-mediated rejection, protilátkami zprostředkovaná rejekce
ANOVA	analysis of variance, analýza rozptylu
APC	allophycocyanin, alofykocyanin
AR	acute rejection, akutní rejekce
BL	borderline changes, hraniční změny
Breg	regulatory B cells, regulační B lymfocyty
BSA	bovine serum albumin, hovězí sérový albumin
C3orf23	chromosome 3 open reading frame 23 (gene)
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid, komplementární deoxyribonukleová kyselina
CD247	CD247 molecule (gene)
CD79B	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta (gene)
CIT	cold ischemic time, doba studené ischemie
CM	cross-match test, křížová zkouška
CNI	calcineurin inhibitor, inhibitor kalcineurinu
CsA	cyclosporine A, cyklosoprin A
DGF	delayed graft function, opožděný rozvoj funkce
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
ECD	energy coupled dye
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová
eGFR	estimated glomerular filtration rate, odhadnutá rychlost glomerulární filtrace
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzymová imunoanalýza
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot, bodová enzymová imunoanalýza
FCS	fetal calf serum, fetální telecí sérum
FITC	fluorescein isothiocyanate, fluorescein isothiokyanát
FOXP3	forkhead box P3 (gene)
FoxP3	forkhead box P3 (protein)
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gene)
GZMB	granzyme B (gene)
HGF	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
HLA	human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen
HLA MM	HLA mismatch, neshoda v HLA
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (gene)
ICOS	inducible costimulator, inducibilní kostimulátor (gene, protein)
IFN- γ	interferon-gamma, interferon-gama
IL	interleukin
IL-1 β	interleukin 1 beta

mAb	monoclonal antibody, monoklonální protilátky
MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1 (gene)
MMF	mycophenolate mofetil, mykofenolát mofetil
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1 (gene)
NK	natural killer (cells), přirození zabíječi (buňky)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, mononukleární buňky z periferní krve
PBS	phosphate buffered saline, fyziologický roztok pufovaný fosfátem
PC5	phycoerythrin-cyanine 5, fykoerytrin-cyanin 5
PC7	phycoerythrin-cyanine 7, fykoerytrin-cyanin 7
PE	phycoerythrin, fykoerytrin
PGK1	phosphoglycerate kinase 1 (gene)
PRA	panel reactive antibody, panel reaktivní protilátky
PRF1	perforin 1 (pore forming protein; gene)
PU	proteinuria, proteinurie
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce reverzní transkripcí
rATG	rabbit anti-thymocyte globulin, králičí anti-thymocytární globulin
RD1	rhodamine, rodamin
TAC	tacrolimus
TCAIM	T cell activation inhibitor, mitochondrial (gene)
TCL1A	T cell leukemia/lymphoma 1A (gene)
TCMR	T cell-mediated rejection, T buňkami zprostředkovaná rejekce
TCR	T cell receptor, receptor T lymfocytů
TLR5	toll-like receptor 5 (gene)
TMEM176B	transmembrane protein 176B (gene)
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
TOAG-1	tolerance-associated gene 1 (gene)
TORID	tolerance related and induced transcript (gene)
Treg	regulatory T cells, regulační T lymfocyty
RF	rejection-free, bez rejekce
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
RQ	relative quantity, relativní množství
SCr	serum creatinine, sérový kreatinin
SEM	standard error of the mean, standardní chyba střední hodnoty

1. ÚVOD

Transplantace ledviny je metodou volby léčby nemocných s nezvratným selháním ledvin, protože je spojena s delším přežitím nemocných v porovnání s ostatními metodami náhrady funkce ledvin. Pro dlouhodobé přijetí transplantované ledviny je zatím nezbytná dlouhodobá účinná imunosuprese. Při nedostatečné imunosupresi může dojít k rejekci štěpu, která může způsobit poškození štěpu vedoucí k jeho dysfunkci. Podle časového hlediska se rejekce dělí na akutní a chronické. Podle toho, jaký typ imunitní odpovědi se při rejekci uplatní, na humorální (zprostředkované protilátkami, antibody-mediated rejection, ABMR) a celulární (zprostředkované T lymfocyty, T cell-mediated rejection, TCMR). Mnoho rejekcí má současně přítomné obě formy.

Zavedením kalcineurinových inhibitorů (CNI) cyklosporinu A (1985) a tacrolimu (1994) do klinické praxe došlo k významnému snížení výskytu akutních rejekcí po transplantaci a tím i ke zlepšení přežívání štěpů i příjemců v časném období po transplantaci, dlouhodobé přežívání štěpů se však výrazně nezlepšilo a chronická rejekce zůstává hlavní příčinou ztráty funkce štěpu v pozdním období po transplantaci (Amico, 2010). Používání nových účinných imunosupresivních režimů je navíc spojeno s významně vyšším rizikem vzniku kardiovaskulárních onemocnění, infekcí, diabetu, malignit a lékové nefrotoxicity. Tumory a kardiovaskulární choroby jsou nejčastějšími příčinami úmrtí po transplantaci ledviny, zatímco infekce jsou nejčastější příčinou nemocnosti a nejčastější indikací k hospitalizaci (Dharnidharka *et al.*, 2004).

V nedávné minulosti jsme byli svědky snah o podávání co nejmenších dávek imunosupresiv. Cílem bylo snížit rizika vzniku výše uvedených komplikací spojených s imunosupresivní léčbou. Tato strategie ale neměla očekávaný pozitivní dopad na dlouhodobé výsledky transplantací ledvin především pro často pozorované zhoršení funkce štěpů a pozdní rejekce. Problém spočívá v neschopnosti rozpoznat ty nemocné, u kterých je snížení dávek imunosupresiv bezpečné.

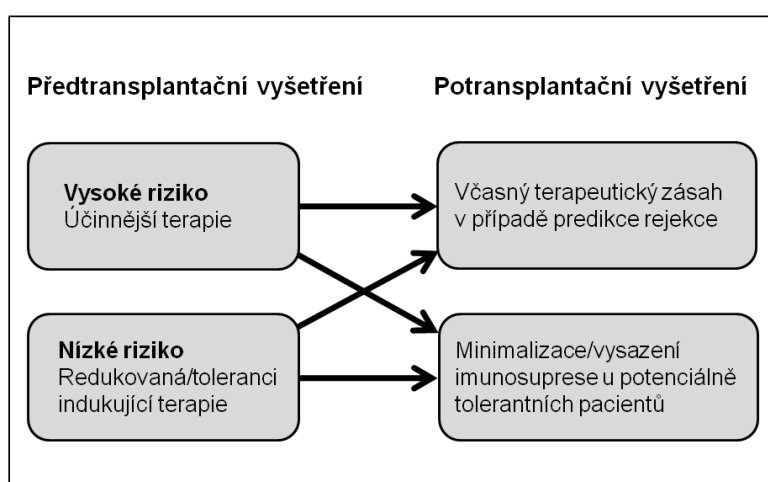
Ideálním řešením by bylo mít k dispozici takové testy, které popíší vlohly k imunitní reaktivitě, spolehlivě vyhodnotí míru aloreaktivity a umožní tak identifikovat markery, které korelují s imunitní neodpovídavostí k alogennímu štěpu, tedy markery tolerance.

Proto se v posledních letech věnuje velká pozornost fenoménu operační tolerance. Ten je náhodně zjišťován u pacientů po transplantaci ledvin (nebo jater), kteří přestali užívat imunosupresi v důsledku noncompliance nebo z nutnosti vysazení například pro malignitu nebo lékovou toxicitu (Ashton-Chess *et al.*, 2007).

1.1. Definice tolerance

Skutečná, pravá tolerance štěpu byla definována již v roce 1953 Billinghamem *et al.* jako absence histologických známek rejekce v nepřítomnosti jakéhokoli imunosupresivního léčiva u imunokompetentního příjemce schopného přijmout druhý štěp od stejného dárce, zatímco štěp od jiného dárce by byl odhojen (Billingham *et al.*, 1953). Pionýrské práce Haška (Hasek *et al.*, 1955) přinesly stejné závěry jako práce Medawara a spol. (Medawar, 1956).

V klinické medicíně se používá termín „operační tolerance“ (“operational tolerance“) nebo „klinická operační tolerance“ (“clinical operational tolerance“). Operační tolerance je definována jako absence známek poškození štěpu (funkčních i histologických) u pacientů po transplantaci bez imunosupresivní terapie více jak 1 rok. Stav operační tolerance po transplantaci ledviny je popisován relativně zřídka (<0,1%) v porovnání s výskytem po transplantaci jater (zhruba 10% - 15%) (Martinez-Llordella *et al.*, 2008; Martinez-Llordella *et al.*, 2007; Roussey-Kesler *et al.*, 2006). V posledních letech je předmětem klinických studií několik protokolů s cílem navodit trvalé přijetí štěpu s žádnou nebo nízkodávkovou imunosupresí za použití ozáření, transplantace hematopoetických kmenových buněk, imunosuprese, případně speciálních buněčných populací včetně expandovaných regulačních T lymfocytů (Treg) (Elias *et al.*, 2015; Girmanova *et al.*, 2015). Dosavadní výsledky ale zatím neumožňují bezpečné širší použití. Proto se hledají nové biomarkery, které by identifikovaly předtransplantační imunitní riziko a po transplantaci včas odhalily začátek imunitní odpovědi proti štěpu (markery rejekce) nebo naopak stav neodpovídavosti vůči štěpu (markery tolerance), což by umožnilo nastavit imunosupresivní terapii dle potřeby každého pacienta (individualizovaná imunosuprese), čili předejít tomu, aby funkce imunitního systému byly potlačeny méně nebo více, než je třeba (Obrázek 1.1).



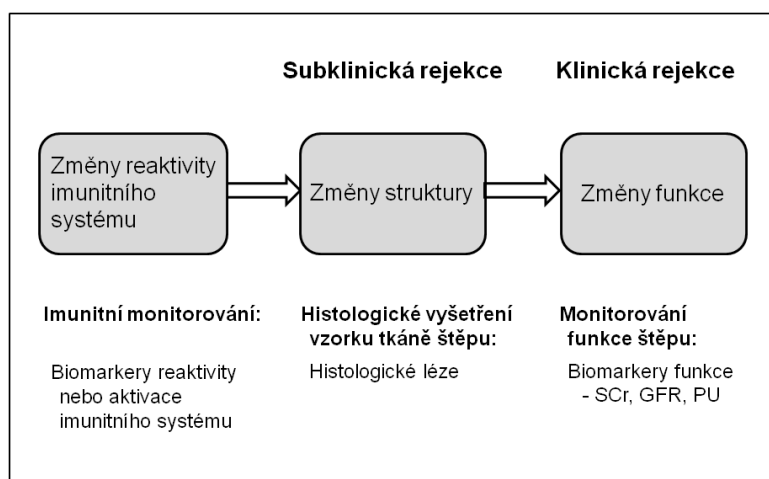
Obrázek 1.1 Individualizace imunoprese, dle Sawitzki (Sawitzki *et al.*, 2009). Nové biomarkery by měly napomoci při stratifikaci pacientů dle imunitního rizika před transplantací, a tak i volbě imunopresivní terapie, po transplantaci pak předpovědět rejekci a umožnit včasný terapeutický zásah nebo naopak identifikovat potenciálně tolerantní pacienty, u kterých může být imunoprese bezpečně minimalizována.

1.2. Definice biomarkeru

Biomarker je definován jako znak, který je objektivně měřitelný a hodnotitelný jako indikátor normálních biologických procesů, patologických procesů nebo farmakologické odpovědi na terapeutickou intervenci. (Lesko a Atkinson, 2001)

Konvenčními a rutinně užívanými testy po transplantaci ledvin jsou měření sérového kreatininu, odhad glomerulární filtrace a proteinurie. Tyto biomarkery funkce štěpu mohou upozornit na rejekční epizodu. Jsou však nespecifické – zhoršení funkce štěpu může být také zapříčiněno například lékovou toxicitou, zhoršeným krevním zásobením štěpu nebo obstrukcí vývodných cest močových. Kromě klinicky zřejmé rejekce, charakterizované poklesem funkce štěpu, může probíhat i rejekce bez klinických známek – subklinická (Rush *et al.*, 1998). Samotné biomarkery funkce tak k identifikaci rejekce nejsou použitelné. Zatím jediným běžně užívaným diagnostickým nástrojem k odhalení rejekce je histologické vyšetření vzorku tkáně štěpu získaného biopsií. K té se přistupuje v případě zhoršení funkce transplantátu a dále se na většině pracovišť provádí u všech pacientů šest týdnů nebo tři měsíce po transplantaci. Zařazení této tzv. protokolární biopsie do vyšetřovacího protokolu je opodstatněno právě existencí subklinické rejekce (Nankivell a Chapman, 2006).

Změnám funkce štěpu předchází strukturální změny, které následují po změnách imunitní reaktivity. Výše zmíněné biomarkery nepodávají informaci o stavu imunitního systému. Hledají se proto nové, imunitní markery, které by tuto informaci podaly a pomohly tak zamezit vzniku imunitní reakce nebo jejímu plnému rozvoji, který by pak vyústil v poškození štěpu (Obrázek 1.2).



Obrázek 1.2 Změny při rejekci a jejich monitorování. Změnám funkce štěpu předchází strukturální změny, které následují po změnách imunitní reaktivity. Biomarkery funkce jsou sérový kreatinin (SCr), rychlost glomerulární filtrace (GFR) a proteinurie (PU). Histologické vyšetření umožní odhalit strukturální změny. Hledají se imunitní markery, které by podaly informaci o stavu imunitního systému a pomohly tak zamezit vzniku imunitní reakce nebo jejímu plnému rozvoji, který by pak vyústil v poškození štěpu.

2. PŘEHLED PROBLEMATIKY

Stav imunitního systému před transplantací i po ní lze hodnotit funkčními testy, fenotypizací leukocytů a genovou a proteinovou expresní analýzou. Mezi funkční testy patří metody k detekci anti-HLA protilátek (stanovení panel reaktivních protilátek (PRA), cross-match test (CM), Luminex) a donor reaktivních T lymfocytů (IFN- γ ELISPOT). Fenotypizace leukocytů se provádí pomocí průtokové cytometrie. Genová expresní analýza využívá microarray technologie a metody kvantitativní real-time RT-PCR (qRT-PCR). K analýze proteinové exprese slouží metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, enzymová imunoanalýza).

2.1. Současné možnosti predikce rejekce před transplantací

Hlavními faktory, které ovlivňují dlouhodobé výsledky transplantace ledviny, jsou předtransplantační poškození štěpu (dárcovské faktory, prodloužená ischemie štěpu, smrt mozku dárce) (Pratschke *et al.*, 2008; Reutzel-Selke *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2007) a donor-reaktivní imunologická paměť (buněčná i protilátková). Ta je výsledkem předchozí senzitivace imunitního systému příjemce expozicí cizím lidským leukocytárním antigenům (HLA; např. při opakovaných transfuzích, těhotenství, předchozí transplantaci) nebo tzv. heterologní imunitou (infekčním agens navozená tvorba T lymfocytů se zkříženě reaktivní specificitou) (Augustine *et al.*, 2008; Nickel *et al.*, 2004).

Pomocí CM založeném na komplement dependentní cytotoxicitě (CDC CM neboli klasický CM), rutinně prováděného před každou transplantací, jsou identifikováni pacienti s preexistujícími donor-specifickými protilátkami, které by mohly po transplantaci způsobit hyperakutní rejekci vedoucí ke ztrátě štěpu. Předpokládá se, že důvodem vzniku rejekce po vysazení imunosuprese jsou při nepřítomnosti preexistujících donor-specifických protilátek paměťové T lymfocyty reagující na dárcovské antigeny (Ford *et al.*, 2009). Přestože je klíčová role donor-specifických T lymfocytů při vzniku rejekce již dlouho známá, jejich přítomnost v krvi příjemců transplantované ledviny není zatím pomocí metody IFN- γ ELISPOT běžně vyšetřována (Sawitzki *et al.*, 2009).

Při hodnocení předtransplantačního rizika je hlavním cílem odhad buněčné a protilátkové alosenzitivace. K tomu jsou využívány funkční testy a genová a proteinová expresní analýza. Pro detekci HLA protilátek se používá klasická metoda založená na CDC (stanovení PRA a klasický CM) a nověji metody využívající ELISA a průtokovou cytometrii (Luminex a flow CM). Přehled předtransplantačních vyšetření je uveden v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1 Současné možnosti předtransplantačního vyšetření rizika rejekce.

Metoda	Biomarker	Imunitní mechanismus
PRA, CM, Luminex	anti-HLA protilátky	protilátková alosenzitizace
IFN- γ ELISPOT	donor-reaktivní T lymfocyty	buněčná alosenzitizace
ELISA	sCD30	buněčná imunita

CD – cluster of differentiation, povrchové molekuly leukocytů; CM – cross-match test, křížová zkouška; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, enzymová imunoanalýza; ELISPOT – enzyme-linked immunosorbent spot, bodová enzymová imunoanalýza; HLA – human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen; IFN- γ – interferon-gama; PRA –panel reaktivní protilátky; „s“ – soluble, rozpustný

Panel reaktivní protilátky (PRA). U všech pacientů zařazených na čekací listinu je každé tři měsíce hodnocena četnost PRA odrážející reaktivitu séra (od čekatele na transplantaci) vůči panelu buněk se známými HLA antigeny. Imunologické riziko vyjádřené procentem PRA hraje roli při alokaci ledvin a při volbě immunosupresivního režimu. Z pacientů v normálním pořadí na čekací listině jsou upřednostňováni ti s vysokou frekvencí protilátek proti HLA. Imunosupresivní protokoly s indukční terapií jsou vyhrazeny pro pacienty se středně vysokým a vysokým imunologickým rizikem, které je definováno množstvím PRA.

Cross-match test (CM). Před transplantací se provádí cross-match test neboli křížová zkouška, která ukáže reaktivitu příjemce na buňky dárce. Pozitivní CM je ve většině transplantačních center považován za absolutní kontraindikaci k provedení transplantace, i když již existují protokoly, které transplantaci umožní (ovšem za cenu silné immunosuprese a horších výsledků). Kromě standardní křížové zkoušky se v praxi používá i křížová zkouška s využitím průtokové cytometrie (FCXM, flow cross-match), která je minimálně 10x citlivější a zachycuje i protilátky nevážající komplement (necytotoxické).

Luminex. V posledních letech byly představeny metody detekce protilátek založené na vazbě na pevnou fázi. Nejpoužívanější se stal Luminex, který využívá polystyrénové mikrokuličky s fluorochemy různé intenzity a s HLA antigeny navázanými na jejich povrch. Luminex má větší senzitivitu než CDC metody. Na rozdíl od nich detekuje i protilátky nevážající komplement, přesně definuje protilátky namířené proti jednotlivým lokusům i jednotlivým alelám, umožňuje kalkulaci virtuálního PRA a predikci pozitivního cross-match testu (virtuální cross-match; review (Tait *et al.*, 2009)).

IFN- γ ELISPOT. Detekci a kvantifikaci paměťových/efektorových aloreaktivních T lymfocytů umožňuje relativně nová, vysoce senzitivní metoda IFN- γ ELISPOT (enzyme-linked immunosorbent spot). Využívá sendvičovou ELISA k měření IFN- γ tvořeného lymfocyty příjemce po jejich stimulaci buňkami dárce. T lymfocyty, které se zatím nesetkaly s antigeny, jimž jsou při testu vystaveny, budou reagovat jen malou produkcí IFN- γ na rozdíl od presenzitizovaných lymfocytů.

Vysoká frekvence donor-reaktivních T lymfocytů před transplantací koreluje s rizikem těžké akutní rejekce v časném potransplantačním období (Bellisola *et al.*, 2006; Heeger *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2007;

Nickel *et al.*, 2004) a je nezávislá na jiných známých korelátech presenzitizace jako je vysoká koncentrace PRA, předchozí transplantace, krevní transfuze a těhotenství (Nickel *et al.*, 2004). Nekoreluje s počtem neshod v HLA A, B a DR (Heeger *et al.*, 1999). Donor-reaktivní buněčná senzitivace nemusí znamenat humorální senzitivaci a naopak. Z uvedeného vyplývá, že pacienti s vysokou frekvencí T lymfocytů produkujících IFN- γ by mohli profitovat z terapie imunosupresivy, která působí inhibicí nebo deplecí paměťových T buněk. Augustine *et al.* (Augustine *et al.*, 2008) ukázali výrazný pokles rejekcí u pacientů s pozitivním ELISPOT, kteří dostali indukční terapii (anti-thymocytární globulin nebo anti-CD25 protilátku). Současně došlo po transplantaci k poklesu T lymfocytů produkujících IFN- γ . Naopak u pacientů s negativním ELISPOT s indukcí a bez ní byl výskyt rejekcí srovnatelný. Z toho vyplývá, že předtransplantační měření donor-reaktivní buněčné imunity by mohlo sloužit k individualizaci indukční terapie.

sCD30. Jako slibný marker rejekce štěpu spojený se zhoršenými výsledky transplantace se jevila vysoká sérové koncentrace molekuly sCD30 před transplantací (i po ní) (Heinemann *et al.*, 2007; Pelzl *et al.*, 2002; Susal *et al.*, 2002; Susal *et al.*, 2003). Vzniká odštěpením membránově vázané kostimulační molekuly CD30 (exprimované po aktivaci T lymfocytů) z buněčného povrchu. U zdravých jedinců se nachází v nízkých sérových koncentracích; vyšší sérové koncentrace byly detekovány za patologických situací jako je systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritida a další (Schlaf *et al.*, 2007). Využití sCD30 k předtransplantační stratifikaci rizika ale ztěžuje nálezy velkých interindividuálních rozdílů v sérových koncentracích u potenciálních příjemců ledvinných štěpů (Altermann *et al.*, 2007). Příjemci ledviny, kteří měli před transplantací vyšší hodnoty sCD30 a zároveň nižší hodnoty HGF (hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů), měli zvýšený výskyt ABMR (Pavlova *et al.*, 2011).

2.2. Potransplantační vyšetření

Cílem potransplantačního vyšetření je identifikovat pacienty s větším rizikem rejekce nebo s počínající rejekcí a včas terapeuticky zasáhnout nebo naopak rozpoznat pacienty, u kterých může být imunosuprese minimalizována nebo dokonce vysazena. Jak bylo výše uvedeno, k diagnostice subklinické i klinické rejekce se běžně používá jen histologické vyšetření biopsicky získaného vzorku tkáně štěpu. Ideální by bylo nahradit tuto invazivní metodu s nízkou senzitivitou metodami neinvazivními nebo méně invazivními a citlivějšími. Proto jsou hledány biomarkery stanovitelné v krvi a v moči (biomarkery v moči se tato práce samostatně nezabývá). Ke stanovení biomarkerů imunitního stavu po transplantaci se taktéž využívají metody detekce donor-reaktivních protilátek a T lymfocytů, analýza genové a proteinové exprese a dále také fenotypizace leukocytů. Přehled potransplantačních vyšetření je uveden v tabulce 2.2. Jednotlivé biomarkery jsou podrobně popsány v následujícím testu.

Tabulka 2.2 Potransplantační vyšetření; biomarkery, metody jejich stanovení a imunitní procesy, o nichž biomarkery vypovídají.

	Metoda	Biomarker	Imunitní mechanismus
rejekce	PRA, CM, Luminex	anti-HLA protilátky	protilátková alosenzitizace
	IFN- γ ELISPOT	donor-reaktivní T lymfocyty	buněčná alosenzitizace
	ELISA	sCD30	buněčná imunita
	analýza genové exprese	granzym B, perforin	buněčná cytotoxicita
		CD154, ICOS	kostimulace
	CD247, TLR5	rozpoznání cizích antigenů	
tolerance	průtoková cytometrie	CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ Treg	Imunoregulace, převaha imunoregulace (suprese)
		podíl paměťových CD4 ⁺ či CD8 ⁺ T lymfocytů a CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	
		podíl Treg/Teff	
		Breg	
	analýza genové exprese	FOXP3, FOXP3/ α -1,2-manosidáza	regulace T-buněčné apoptózy
TCAIM		funkce dendritických buněk	
TMEM176B		klidový stav imunitního systému či převaha regulačních (supresivních) imunitních mechanismů	
	geny tvořící „otisk tolerance“		
	geny asociované s funkcí B lymfocytů		

Breg – regulační B lymfocyty; CD – cluster of differentiation, povrchové molekuly leukocytů; CM – cross-match test, křížová zkouška; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, enzymová imunoanalýza; ELISPOT – enzyme-linked immunosorbent spot, bodová enzymová imunoanalýza; FOXP3/FoxP3 – forkhead box P3 (gen/ protein); HLA – human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen; ICOS – inducible costimulator, inducibilní kostimulátor; IFN- γ – interferon-gama; PRA – panel reaktivní protilátky; „s“ – soluble, rozpustný; TCAIM – T cell activation inhibitor, mitochondrial (gen); TMEM176B – transmembrane protein 176B (gen); Teff – efektorové T lymfocyty; Treg – regulační T lymfocyty

Biomarkery v krvi

Detekce HLA protilátek, IFN- γ ELISPOT. I v potransplantačním období se používá detekce protilátek proti dárcovským antigenům a to při podezření na humorální rejekci v biopsii štěpu. Potransplantační monitorování IFN- γ produkujících donor-reaktivních T lymfocytů během prvních týdnů může odhalit pacienty s nastupujícím imunitním poškozením štěpu a umožnit tak včasnou úpravu imunosuprese (Nickel *et al.*, 2004).

Regulační T lymfocyty (Treg), FOXP3. V procesu rejekce alogenního štěpu se uplatňují různé populace bílých krvinek. U pacientů s akutní a chronickou dysfunkcí štěpu by měly být detekovatelné odlišné lymfocytární subpopulace než u pacientů se stabilní funkcí štěpu. Předpokládá se, že nemocní s operační tolerancí budou v periferní krvi vykazovat množství specifických znaků charakteristických pro stav tolerance. Nejvíce zkoumanou buněčnou populací v transplantologii se od jejich objevení v roce 1995 staly CD4⁺CD25⁺ regulační T buňky (Sakaguchi *et al.*, 1995). Později byl identifikován transkripční faktor FoxP3, klíčový pro rozvoj a funkci Treg (Bluestone, 2011), jehož mutace nebo nižší exprese jsou u člověka asociovány s některými autoimunitními chorobami. FoxP3 může také být přechodně exprimován v aktivovaných T buňkách, které ale nevykazují regulační funkce (Ziegler, 2007). Dále byly popsány další subpopulace regulačních T lymfocytů – CD4⁺ Tr1 a Th3, CD8⁺CD28⁻, NK T lymfocyty, nicméně za nejdůležitější jsou stále považovány CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Treg hrají důležitou roli v navození a udržení tolerance dárcovských antigenů *in vivo* (Wood a Sakaguchi, 2003).

U zdravých jedinců je imunitní homeostáza udržována rovnováhou mezi efektorovými (Teff) a regulačními T lymfocyty a narušení poměru Treg/Teff může být spojeno s osudem štěpu (Zheng *et al.*, 2003). U pacientů s operační tolerancí po transplantaci ledviny byly v periferní krvi naměřeny vysoké koncentrace CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Treg (Louis *et al.*, 2006). Studie Braudeau *et al.* ukazují redukované množství periferních CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺Treg u pacientů s chronickou rejekcí v porovnání s pacienty se stabilní renální funkcí s imunosupresí i bez ní (pacienti s operační tolerancí) (Braudeau *et al.*, 2007). Vyšší exprese FOXP3 v periferní krvi byly pozorovány u pacientů s operační tolerancí bez nutnosti imunosuprese nebo pacientů se stabilní funkcí štěpu léčených imunosupresí v porovnání s pacienty s chronickou rejekcí (Iwase *et al.*, 2011; Louis *et al.*, 2006). Kreijveld *et al.* (Kreijveld *et al.*, 2008) ukázali větší poměr mezi paměťovými CD8⁺ nebo CD4⁺ a CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg těsně před vysazením tacrolimu u pacientů, u kterých vznikla akutní rejekce po vysazení tohoto CNI oproti pacientům bez rejekce. Dále zaznamenali pokles v zastoupení naivních CD4⁺ buněk u pacientů v nižším riziku akutní rejekce po vysazení tacrolimu. Kombinace obou těchto markerů tvoří test s vysokou prediktivní hodnotou. Vysoký poměr CD4⁺CD25⁺ Treg k CD4⁺ T lymfocytům byl pozorován v krvi pacientů, u kterých se podařilo navodit experimentálně toleranci pomocí režimu zahrnující transplantaci dárcovských hematopoetických buněk (Scandling *et al.*, 2012). V jiném experimentálně použitém tolerogenním režimu s využitím hematopoetických kmenových buněk a „toleranci-facilitujících“ buněk došlo ke zvýšení poměru Treg k Teff u pacientů s trvalým chimersimem (Leventhal *et al.*, 2012).

V posledních letech byl také studován vliv používané imunosuprese na koncentrace Treg. Ukázalo se, že řada imunosupresiv, donedávna považovaných za depleční nebo inhibiční pro všechny druhy T lymfocytů, šetří populaci Treg nebo dokonce podporuje její expanzi.

Podle mezinárodních doporučení by součástí imunosupresivních léčebných protokolů příjemců transplantované ledviny měla být také indukční léčba léčebnými látkami způsobujícími depleci lymfocytů (včetně králíčího anti-thymocytárního globulinu (rATG)) nebo antagonisty receptoru pro IL-2, a to jako prostředek k redukci výskytu akutní rejekce a/nebo prostředek k redukci dávek ostatních součástí imunosupresivního režimu (KDIGO Transplant Work Group, 2009). Mechanismus, jakým tyto léky modulují aloimunitní odpověď, není ještě zcela znám. Lopez *et al.* (Lopez *et al.*, 2006) ukázali, že rATG vedlo k expanzi CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg *in vitro* způsobem závislým na dávce. Studie odhalila dva mechanismy expanze: konverzi CD4⁺CD25⁻ na CD4⁺CD25⁺ buňky a proliferaci přirozeně se vyskytující populace CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů.

V současnosti dostupný antagonist IL-2 receptoru je basiliximab, monoklonální protilátka se specificitou k α řetězci receptoru pro IL-2 (IL-2R α , také známý jako CD25), který je přítomný na aktivovaných lymfocytech. Signalizace přes IL-2/IL-2 receptor (IL-2R) hraje klíčovou roli pro vývoj a proliferaci antigenem aktivovaných T lymfocytů, které zahrnují jak T_H1 tak Treg (Malek *et al.*, 2002; Sadlack *et al.*, 1993). Blokáda IL-2R by tedy mohla mít negativní vliv na rozvoj transplantační tolerance a osud štěpu.

Transkripty cytotoxických lymfocytů a NK buněk. Cytotoxické lymfocyty a přirození zabíječi (NK buňky) hrají důležitou roli při vzniku rejekce štěpu (Wood a Goto, 2012). Jejich efektorovými molekulami jsou granzym B a perforin 1. Perforin tvoří póry v cílové buňce a tak umožní vstup granzymu B a dalších komponent do buňky, což vede k následné apoptóze (Lo *et al.*, 2010). Zvýšení transkriptů cytotoxických lymfocytů a NK buněk jako jsou granzym B a perforin bylo popsáno v periferní krvi příjemců transplantované ledviny v době klinické diagnózy akutní rejekce nebo dokonce o několik dní dříve (Sabek *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2003).

Povrchové receptory leukocytů. V periferní krvi pacientů s dlouhodobě přežívajícími ledvinnými štěpy byla snížena transkripce genu CD247 (Alvarez *et al.*, 2004; Baniyash, 2004). CD247 je ζ -řetězec receptoru T lymfocytů (TCR), který je součástí komplexu TCR-CD3 na T lymfocytech a aktivačních receptorů na NK buňkách (Baniyash, 2004). U pacientů s operační tolerancí byla také popsána snížená exprese TLR5 (toll-like receptor 5) (Sagoo *et al.*, 2010). TLR5 je člen TLR receptorové rodiny, která hraje zásadní roli v rozpoznání patogenu a aktivaci přirozené imunity.

Kostimulační geny. Alakulppi *et al.* (Alakulppi *et al.*, 2007) ukázali, že vyšší exprese kostimulačních genů CD154 a ICOS (inducibilní kostimulátor), je spojena s akutní rejekcí.

TCAIM (TOAG-1) a α -1,2-manosidáza. Skupina Volka (Sawitzki *et al.*, 2007) identifikovala na dvou transplantačních modelech (transplantace ledviny u potkanů a srdce u myší) dva nové markery k predikci rejekce a trvalého přijetí štěpu – TCAIM a α -1,2-manosidáza.

TCAIM (T cell activation inhibitor, mitochondrial; nejdříve popsán jako TOAG-1, tolerance-associated gene 1) je gen kódující mitochondriální protein, jehož zvýšená exprese vede k zesílení apoptózy T lymfocytů (Keeren *et al.*, 2009). Další studie ukázaly, že TCAIM kontroluje aktivaci T lymfocytů a podporuje indukci tolerance pravděpodobně regulací mitochondriální distribuce a produkce mitochondriálních reaktivních forem kyslíku mediované skrze aktivaci TCR (Schumann *et al.*, 2014).

α -1,2-manosidáza je důležitá pro N-glykosylaci membránově vázaných a secernovaných proteinů. Při její inhibici dochází ke zvýšení produkce IL-2, důležitého k přežití, proliferaci a diferenciaci T lymfocytů. Exprese obou těchto genů byla vysoká při přijetí štěpu, klesala při rejekci a silně pozitivně korelovala s funkcí štěpu v experimentálním modelu. K poklesu těchto markerů v krvi i ve štěpu došlo tři dny před akutní rejekcí (Sawitzki *et al.*, 2007). Asociace vyšší exprese α -1,2-manosidázy s přijetím štěpu pozorovaná v experimentálním modelu se však nepotvrdila v klinických studiích, ve kterých byla α -1,2-manosidáza hodnocena spíše jako marker rejekce. U pacientů s operační tolerancí byl vyšší podíl genové exprese FOXP3 k α -1,2-manosidáze v porovnání s pacienty s chronickou rejekcí (Sagoo *et al.*, 2010).

TMEM176B. TMEM176B je gen (původně popsán jako TORID) kódující transmembránový protein, který je exprimovaný na klidových makrofázích a nezralých dendritických buňkách (Condamine *et al.*, 2010; Louvet *et al.*, 2005). V modelu indukované tolerance po transplantaci srdce navozené krevní transfuzí byl zvýšeně exprimován u dlouhodobě přežívajících štěpů bez známek chronické rejekce (Louvet *et al.*, 2005). Pozdější studie ukázala, že protein TMEM176B je zodpovědný za fagozomální kationový proud, který je potřebný pro kontrolu fagozomálního pH v dendritických buňkách (Segovia *et al.*, 2014), které je kritické pro zkříženou prezentaci exogenních antigenů.

„Otisk tolerance“, transkripty genů spojených s funkcí B lymfocytů. Práce Brouard *et al.* (Brouard *et al.*, 2007) vedla k identifikaci biomarkerů v krvi, specifických pro stav operační tolerance. Porovnáním vzorků od pacientů s operační tolerancí, pacientů s chronickou rejekcí a zdravých dobrovolníků za užití metody cDNA microarray identifikovali „otisk tolerance“ (“tolerant footprint“) zahrnující 49 genů schopných odlišit s vysokou specificitou fenotyp tolerance a chronické rejekce. Tento genový podpis odráží klidový stav imunitního systému.

Velkou pozornost si v posledních letech získaly geny spojené s funkcí B lymfocytů. Studie konsorcia The Indices of Tolerance identifikovala řadu markerů v periferní krvi, které umožnily u příjemců transplantované ledviny spolehlivě rozlišit pacienty s operační tolerancí bez potřeby imunosuprese a pacienty s chronickou rejekcí (Sagoo *et al.*, 2010). Šest z deseti genů, které nejlépe odlišily pacienty s operační tolerancí od ostatních skupin, byly spojené s funkcí B lymfocytů (Sagoo *et al.*, 2010). Také ve studiích jiných konsorcií byla zjištěna vyšší exprese genů asociovaných s funkcí B lymfocytů u

pacientů s operační tolerancí v porovnání s pacienty se stabilní funkcí štěpu (Newell *et al.*, 2010) či s pacienty s intersticiální fibrózou a tubulární atrofií (Brouard *et al.*, 2007).

B regulační lymfocyty (Breg). Do nedávna byly B lymfocyty primárně spojovány s rozvojem rejekce, v níž se uplatňují skrze prezentaci antigenu, produkci cytokinů a diferenciaci v plasmatické buňky produkující protilátky (Zarkhin *et al.*, 2010). Postupně ale přibývají důkazy o existenci subpopulací B lymfocytů, které mají regulační funkce. Ve většině studií je pro funkci Breg zásadní IL-10 a schopnost jej produkovat je zatím jediným znakem definující Breg. IL-10⁺ B lymfocyty jsou bohatěji zastoupeny v řadě subpopulací, jako jsou „memory-like“ B lymfocyty, transienční B lymfocyty ale i plasmatické buňky (Crespo *et al.*, 2015). V řadě studií byly zvýšeny počty periferních B lymfocytů se zvýšením naivních a transitorních subpopulací u pacientů s operační tolerancí v porovnání s pacienty s chronickou rejekcí či se stabilní funkcí štěpu na imunosupresi (Chesneau *et al.*, 2014; Newell *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010).

Biomarkery v biopsii, protokolární biopsie

Protokolární biopsie hraje zatím nezastupitelnou roli v diagnostice subklinické (i klinické) rejekce. Cestou k zavedení méně invazivních diagnostických metod je studium korelace biomarkerů rejekce, přijetí štěpu a dlouhodobé funkce štěpu ve tkáni transplantátu s funkcí štěpu a nálezem stejných biomarkerů v krvi a moči (Viklicky *et al.*, 2013). Předmětem výzkumu jsou také odlišné molekulární fenotypy předpovídající riziko progresu rejekce a selhání štěpu. Snaha o klinické využití těchto poznatků má velký význam, dokud se nestane protokolární biopsie nahraditelnou.

Treg, FOXP3. Jak bylo uvedeno výše, FoxP3 není výlučným znakem regulačních T buněk, ale je také přechodně exprimován většinou aktivovaných T buněk. V moči pacientů s biopsií potvrzenou diagnózou akutní rejekce byly nalezeny vyšší koncentrace FOXP3 mRNA v porovnání s pacienty bez rejekce. Vyšší koncentrace FOXP3 mRNA však korelovaly s delším přežitím štěpu (Muthukumar *et al.*, 2005). Studie Bunnag *et al.* (Bunnag *et al.*, 2008) potvrdila vyšší exprese FOXP3 ve štěpech pacientů po transplantaci ledviny s probíhající akutní rejekcí v porovnání s pacienty bez rejekce, avšak nepotvrdila asociaci s budoucí lepší funkcí štěpu. Dle této práce se FoxP3⁺ buňky nebo jejich prekurzory hromadí v místech zánětu jako strategie ke kontrole možného vzniku autoimunity (Bunnag *et al.*, 2008).

Závěr, že přítomnost FoxP3⁺ Treg ve štěpu hraje důležitou roli v jeho přijetí, učinili Bestard *et al.* (Bestard *et al.*, 2007) a Kawai *et al.* (Kawai *et al.*, 2008). První našli mezi transplantovanými, kteří byli léčeni rATG a sirolimem, skupinu pacientů vykazující sníženou donor specifickou odpověď, která byla vázána na cirkulující Treg a přítomnost FoxP3⁺ buněk ve štěpu. Druzí popsali navození tolerance transplantací kostní dřeně a ledviny od příbuzných žijících dárců s neshodou v HLA a její udržení i po ztrátě chimerismu asociované s přítomností Treg ve štěpu. Tento nález naznačuje, že FoxP3⁺ buňky ve štěpu mohou indukovat lokální toleranci.

Transkripty cytotoxických lymfocytů a NK buněk. Byla prokázána silná korelace exprese transkriptů cytotoxických lymfocytů jako je granzym B a perforin ve štěpu s nálezem akutní rejekce po transplantaci ledvin (Lipman *et al.*, 1992; Lipman *et al.*, 1994). Podle složení transkriptů cytotoxických lymfocytů lze dokonce odlišit na terapii rezistentní a senzitivní rejekci (Nickel *et al.*, 2001).

TCAIM a α -1,2-manozidáza. Snížení exprese těchto dvou genů, objevených skupinou Volka a Sawitzké, ve štěpu i v periferní krvi tři dny před rejekcí na zvířecím modelu již bylo zmíněno výše. K možnému klinickému využití těchto dvou genů jako markerů přijetí štěpu je nutné provést jejich expresní analýzu u člověka.

Cytokiny a chemokiny. Výzkumy v transplantační laboratoři IKEM ukázaly, že nemocní se zvýšenou genovou expresí TGF- β 1 a MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) jsou ve vyšším riziku budoucího selhání (Hribova *et al.*, 2007) a že pacienti se specifickým molekulárním fenotypem rejekce (snížená exprese CD20) jsou v riziku její rezistence k léčbě a rychlejší ztráty funkce transplantované ledviny (Viklicky *et al.*, 2010).

3. HYPOTÉZY A CÍLE

Hypotézy

Předpokládali jsme, že indukční imunosuprese rATG vede k vzestupu počtu Treg a změněné expresi dalších biomarkerů transplantační tolerance, které se uplatňují v dlouhodobém přijetí štěpu. Stejně tak by po podání rATG mělo dojít ke změně exprese markerů rejekce asociovaných s T lymfocyty. Indukční léčba basiliximabem (jakožto nedepleční protilátkou zamířenou proti receptoru pro IL-2) nemusí ovlivnit počty Treg, ale může ovlivnit expresi biomarkerů tolerance či rejekce asociovaných s T lymfocyty.

Dále jsme očekávali, že přítomnost a/nebo změněné množství nově identifikovaných biomarkerů transplantační tolerance (či rejekce) v periferní krvi a v biopsicky získaném vzorku tkáně ledvinného štěpu u pacientů po transplantaci ledviny jsou spojeny s přijetím štěpu a absencí rejekce (či naopak s přítomností rejekce).

Cíle

1. Zhodnotit efekt různé indukční léčby na regulační T lymfocyty v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny a analyzovat asociaci počtů těchto buněk s krátkodobými výsledky transplantace. Prokázat, že u pacientů s vyšším rizikem rejekce dojde po podání indukční terapie rATG ke změně počtu regulačních T lymfocytů.
2. Zhodnotit efekt (a případný tolerogenní potenciál) různé indukční léčby na expresi genů asociovaných s tolerancí či rejekcí a počty lymfocytárních subpopulací exprimujících tyto geny v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny.
3. Monitorovat změny v monocytárních subpopulacích a jejich distribuci v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny léčených standardní imunosupresí také s ohledem na různé použité imunosupresivní režimy.
4. Zjistit, zda změny v míře exprese genů asociovaných s operační tolerancí budou v periferní krvi a ve štěpu příjemců ledviny léčených imunosupresí spojeny s absencí rejekce v transplantované ledvině.

4. METODY

Studie vychází z řešení grantového projektu (IGA MZCR NS 10517-3/2009), jehož cílem bylo analyzovat různé markery rejekce a tolerance v prospektivní observační studii.

4.1. Pacienti a vzorky

Do studie bylo zařazeno celkem 75 pacientů, kterým byla transplantována ledvina od zemřelého dárce v období mezi zářím 2009 a listopadem 2010 v Transplantacentru Institutu klinické a experimentální medicíny. Základními zařazovacími kritérii byl písemný informovaný souhlas, standardní léčebný protokol a dostupnost průtokové cytometrie (dostupná pouze ve všední dny). Protokol studie byl schválen Etickou komisí Institutu klinické a experimentální medicíny (č. 608-08-10).

Pacienti byli léčeni podle léčebného protokolu centra, který zahrnoval trojkombinaci udržovací imunosupresivní terapie s kalcineurinovým inhibítozem (CNI, tacrolimus nebo cyklosporin A), mykofenolát mofetilem a kortikosteroidy, s indukční imunosupresíí či bez ní. Volba indukční léčby se řídila imunologickým rizikem pacienta. Pacienti s PRA \geq 50% nebo ti, kteří již v minulosti podstoupili transplantaci ledviny, byli léčeni 1-1.5 mg/kg/den rATG (Thymoglobulin®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA n = 28) i.v. ve 2-7 dávkách během prvního týdne po transplantaci. Pacienti s PRA 20-49% nebo ti, kteří obdrželi ledvinu od dárce s rozšířenými kritérii, byli léčeni 2x 20 mg basiliximabu (Simulect®, Novartis, Basel, Switzerland, n = 22) i.v. a to v den transplantace a 4 dny po transplantaci. Pacientům s PRA < 20% nebyla podána žádná indukční léčba (n = 25). Vzorky periferní krve pacientů byly odebrány před transplantací a 7., 14., 21., 28., 60., 90. den a 6 a 12 měsíců po transplantaci. Skupiny pacientů se kromě zastoupení retransplantací, PRA a věku dárce nelišily v klinických charakteristikách (podrobněji viz tabulky v originálním znění článku v kapitole 5. Výsledky).

Ze 75 pacientů 4 pacienti podstoupili graftektomii (4., 20., 58. a 161. den po transplantaci) z důvodu trombózy v. renalis, akutního krvácení po biopsii, primární afunkce štěpu ledviny a sekundární afunkce štěpu ledviny; dva pacienti zemřeli (56. a 80. den po transplantaci) na náhlou smrt a embolii plicnice a dva pacienti vystoupili ze studie 14. respektive 60. den po transplantaci.

Šedesát pacientů splnilo následující kritéria k zařazení do studie vlivu indukce na expresi molekulárních markerů asociovaných s rejekcí a tolerancí: 1) dostatečné množství mRNA získané během alespoň 7 z 9 období sběru vzorků, 2) nezměněná udržovací imunosupresivní léčba a 3) nepřítomnost steroid-rezistentní rejekce.

Šedesát sedm pacientů splnilo zařazovací kritérium pro studii vlivu rejekce na expresi molekulárních biomarkerů asociovaných s rejekcí a tolerancí, což byl dostatek mRNA získaný během alespoň 7 z 9 období sběru vzorků.

Pro studii subpopulací monocytů v periferní krvi byly jako zdravé kontroly použity vzorky od 20 dobrovolníků ve věku 25-50 let bez klinických příznaků nemoci, signifikantních klinických diagnóz a transplantace v anamnéze.

4.2. Renální biopsie a léčba rejekce

Renální biopsie byly prováděny z klinické indikace (při podezření na rejekci) a dále u každého příjemce 90. den po transplantaci dle protokolu („protokolární biopsie“). Histologické nálezy byly hodnoceny podle Banffské klasifikace z roku 2005 (17).

Hraniční změny a T buňkami zprostředkovaná rejekce (TCMR) stupně I a IIA byly léčeny pulzně podávaným methylprednisolonem v celkové dávce 1,5-2 g. TCMR stupně IIB a III a steroid-rezistentní TCMR byly léčeny i.v. podávaným rATG v nejvíce 10 dávkách (2 mg/kg 1. den a 1 mg/kg 2.-10. den). Protilátkami zprostředkovaná rejekce byla léčena výměnnou plazmou a intravenózními imunoglobuliny střídavě obden během 10-denního období.

U pěti pacientů, kteří dostali rATG jako součást léčby rejekce (pacienti ze skupiny bez indukce a s basiliximabem), nebyly vzorky ze všech časových období po podání rATG zařazeny do statistiky porovnání skupin.

4.3. Průtoková cytometrie mononukleárních buněk periferní krve

Vzorky periferní krve byly odebírány do sterilních zkumavek s EDTA. Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) byly izolovány centrifugací na hustotním gradientu (Lymphoprep™, Axis-Shield, Oslo, Norway) a značeny monoklonálními protilátkami (mAb) konjugovanými s fluorochromy. Přibližně 1×10^6 buněk PBMC v objemu 100 μ l v PBS-BSA (phosphate buffered saline – bovine serum albumin) bylo inkubováno s vybranými panely mAb po 20 min za pokojové teploty ve tmě. Barvení k identifikaci FoxP3⁺ Treg bylo provedeno pomocí soupravy Human Regulatory T Cell Staining Kit dle doporučení výrobce (eBioscience, San Diego, CA, USA). Intracelulární značení FoxP3 bylo provedeno po povrchovém značení liniově specifických znaků. Použité panely protilátek jsou souhrnně uvedeny v tabulce 4.1.

Reziduální erythrocyty byly lysovány roztokem Optilyse C (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) po dobu 10 min za pokojové teploty ve tmě. Reakce byla zastavena roztokem CellWash (Beckton Dickinson Bioscience, Benelux, Belgium).

Po obarvení byly vzorky změřeny pomocí průtokového cytometru FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a analyzovány za použití software CxP a Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Analýza pomocí průtokové cytometrie byla prováděna s alespoň 100 případy v gate. Definice analyzovaných buněčných populací pomocí buněčných znaků jsou uvedeny v tabulce 4.2 (v závorkách jsou uvedené zkratky užívané v této práci).

Absolutní počty buněčných populací byly vypočítány z absolutních počtů lymfocytů či leukocytů změřených pomocí hematologického analyzátoru Sysmex (Sysmex Corporation, Japan).

Tabulka 4.1 Panely protilátek použité pro analýzu průtokovou cytometrií.

Název panelu	Protilátka značená fluorochromem	Klon protilátky	Výrobce
Subpopulace T lymfocytů	anti-CD45-FITC	B3821F4A	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	anti-CD4-RD1	SFC112T4D11	
	anti-CD8-ECD	SFC121Thy2D3	
	anti-CD3-PC5	UCHT1	
	anti-CD4-PE	13B8.2	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	anti-CD8-PC7	SFC121Thy2D3	
	anti-CD62L-PC5	DREG56	
	anti-CD45RA-FITC	ALB11	
Treg	anti-CD4-PC7	SFC112T4D11	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	anti-CD25-PC5	B1.49.9	
	anti-CD127-PE	R34.34	
	anti-CD4-FITC	RPA-T4	eBioscience, San Diego, CA
	anti-CD25-APC	BC96	
	anti-Foxp3-PE	PCH101	
B lymfocyty a NK buňky	anti-CD45-FITC	B3821F4A	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	anti-CD56-RD1	N901/NKH1	
	anti-CD19-ECD	J3-119	
	anti-CD3-PC5	UCHT1	
	anti-CD16-PE	3G8	
Subpopulace monocytů	anti-CD36-FITC	FA6.152	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	anti-CD14-PC7	RM052	
	anti-CD16-ECD	3G8	
	anti-CD74-Alexa Fluor 647	LN2	BioLegend, San Diego, CA, USA
	anti-CD163-PE	GHI61	
	anti-CD163-PE	RM3/1	

APC – allophycocyanin, alofykocyanin; ECD – energy-coupled-dye; FITC – fluorescein isothiocyanate, fluorescein isothiokyanát; PE – phycoerythrin, fykoerytrin, PC7 – phycoerythrin-cyanine 7, fykoerytrin-kyanin 7; PC5 – phycoerythrin-cyanine 5, fykoerytrin-kyanin 5; RD1 – rhodamine, rodamin

Tabulka 4.2 Definice analyzovaných buněčných podtypů pomocí buněčných znaků

Celý název (zkratka)	Definice buněčnými znaky
T lymfocyty	CD45 ⁺ CD3 ⁺
Pomocné T lymfocyty (CD4 ⁺)	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
Cytotoxické T lymfocyty (CD8 ⁺)	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺
Efektorové CD8 ⁺ T lymfocyt (Teff)	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁻
Regulační T lymfocyty (Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ CD4 ⁺ FoxP3 ⁺
B lymfocyty	CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD3 ⁻
Přirození zabíječi, natural killer cells (NK)	CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ^{+/-}
Intermediální/neklasické monocyty	CD14 ⁺ CD16 ⁺
Imunosupresivní monocyty	CD14 ⁺ CD163 ⁺

4.4. *In vitro* stimulace a měření periferních mononukleárních buněk

Pro *in vitro* experiment byla použita periferní krev 3 zdravých dobrovolníků (ve věku 30-55let), bez klinických příznaků nemoci, signifikantních klinických diagnóz a transplantace v anamnéze. Periferní krev (50ml) byla odebrána do zkumavek obsahujících EDTA. PBMC byly získány centrifugací na standardním hustotním gradientu Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) a následně resuspendovány v RPMI-1640 mediu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) s přidavkem 10% FCS (fetální telecí sérum), L-glutaminu, penicilinu a streptomycinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a centrifugovány po dobu 10 min při 180 × g.

Po té byly buňky kultivovány v termostatu při 37°C v 5% CO₂ v RPMI-1640 mediu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a stimulovány rATG (v koncentraci 1, 10 a 100 ug/ml), basiliximabem (v koncentraci 1, 10, 100 a 1000 ng/ml) nebo methylprednisolonem (v koncentraci 10, 100 a 1000 ug/ml). Jako negativní kontroly byly použity nestimulované buňky. Buňky byly uvolněny z povrchu kultivačních jamek pomocí Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Zastoupení CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů bylo měřeno v duplikátech pomocí průtokového cytometru FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) v čase 0, 1, 3, 6, 24, 48 a 72 hodin po stimulaci. Viabilita buněk byla posouzena pomocí analyzátoru Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). U buněk stimulovaných rATG po dobu 72hod byla viabilita monocytů narušena, proto nebyla data z tohoto časového období po rATG analyzována.

4.5. Analýza genové exprese

Izolace RNA

Pro analýzu genové exprese z krve byla odebrána periferní krev přímo do zkumavek PAXgene (Qiagen, Hilden, Germany). Krev byla zmražena a skladována při -20°C . RNA z plné krve byla extrahována pomocí soupravy PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) s použitím přístroje QIA cube (Qiagen, Hilden, Germany).

Pro analýzu genové exprese ze vzorku tkáně transplantované ledny bylo použito malé množství tkáně získané renální biopsií, které bylo okamžitě po odebrání skladováno v roztoku RNAlater (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA) při teplotě -20°C nebo -80°C . Ze vzorků ledvinné tkáně byla pomocí soupravy RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) izolována vysoce kvalitní celková RNA, která byla následně eluována v 30ul vody prosté na RNázu.

Čistota a koncentrace RNA byly stanoveny pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Použitá metoda izolace je rutinně užívána v naší laboratoři a byla validována a standardizována na referenčních vzorcích.

Kvantitativní RT-PCR analýza

Pro syntézu komplementární DNA (cDNA) ze 2ug celkové RNA byla použita reverzní transkriptáza SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dle doporučení výrobce. Před reverzní transkripcí byla RNA ošetřena DNázou, tak aby následně syntetizovaná cDNA nebyla kontaminovaná genomovou DNA.

Profily genové exprese 11 vybraných genů asociovaných s tolerancí či rejekcí (*GZMB*, *PRF1*, *CD247*, *FOXP3*, *TCAIM* (*TOAG-1*, *C3orf23*), *MAN1A1*, *TLR5*, *MS4A1*, *CD79B*, *TCL1A*, *TMEM176B*) byly stanoveny pomocí kvantitativní real-time RT-PCR za použití metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$ pro relativní kvantifikaci genové exprese (relative quantity RQ, qRT-PCR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)). Pro vnitřní kontrolu byly použity geny HPRT a PGK1 v analýze vzorků periferní krve a GAPDH a PGK1 v analýze vzorků z renální biopsie.

Jako kalibrátor pro analýzu genové exprese z krve sloužila cDNA jednoho kontrolního vzorku krve. Pro analýzu genové exprese v renální biopsii byla jako kalibrátor použita cDNA získaná reverzní transkripcí komerčně nabízené RNA z ledvinné tkáně (First Choice Human Kidney Total RNA, Ambion, Life Technologies). Kvantifikace mRNA byla provedena v triplicátech pomocí expresní eseje TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) a TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) na přístroji Prism 7900 HT Sequence Detection system (Applied Biosystems). Pro analýzu dat byl použit RQ Manager 1.2. software (Applied Biosystems). Přehled oficiálních zkratk a názvů genů a názvů esejí ke stanovení genové exprese je uveden v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3 Přehled oficiálních zkratk a názvů genů a názvů esejí ke stanovení genové exprese

Symbol genu (jiný symbol)	Název genu	Název eseje
<i>GZMB</i>	granzyme B	Hs01554355_m1
<i>PRF1</i>	perforin 1 (pore forming protein)	Hs00169473_m1
<i>CD247</i>	CD247 molecule	Hs00167901_m1
<i>FOXP3</i>	forkhead box P3	Hs00203958_m1
<i>TCAIM (C3orf23, TOAG-1)</i>	T cell activation inhibitor, mitochondrial	Hs00603313_m1
<i>MAN1A1</i>	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	Hs00195458_m1
<i>TLR5</i>	toll-like receptor 5	Hs00152825_m1
<i>MS4A1</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	Hs00544818_m1
<i>CD79B</i>	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta	Hs00236881_m1
<i>TCL1A</i>	T-cell leukemia/lymphoma 1A	Hs00951350_m1
<i>TMEM176B</i>	transmembrane protein 176B	Hs00962650_m1
<i>HPRT</i>	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Hs01003267_m1
<i>PGK1</i>	phosphoglycerate kinase 1	Hs99999906_m1
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1

4.6. Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí softwarů GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), BMDP PC-90 (BMDP Statistical Software Inc., Los Angeles, CA, USA) a SPSS 20 (IBM Corporation, Somers, NY). Klinické charakteristiky skupin pacientů byly porovnávány pomocí testu Mann-Whitney či Kruskal-Wallis podle rozložení dat (testování normality testem Shapiro-Wilk) u kontinuálních proměnných a χ^2 testem u kategoriálních proměnných. Pro porovnání počtů buněk a RQ mRNA u jednotlivých skupin pacientů byla použita logaritmická transformace a parametrické testování pomocí ANOVA (analysis of variance, analýza rozptylu) pro opakovaná měření s Bonferroniho korekcí či s porovnáním dvou časových bodů uvnitř skupiny nebo gama regrese a zobecněný smíšený lineární model pro opakovaná měření s ajdustací. Pro korelaci klinických a cytometrických dat byl použit Spearmanův korelační koeficient. Data byla vyjádřena jako medián [min; max], absolutní počty (n), medián a interkvartilové rozpětí, odhadnuté marginální průměry \pm SEM. Rozdíly byly uvažovány jako statisticky signifikantní při $P < 0,05$. Použité statistické metody jsou podrobněji popsány v originálních zněních jednotlivých publikací.

5. VÝSLEDKY

5.1. Vliv indukční imunosuprese na regulační T lymfocyty

Úvod

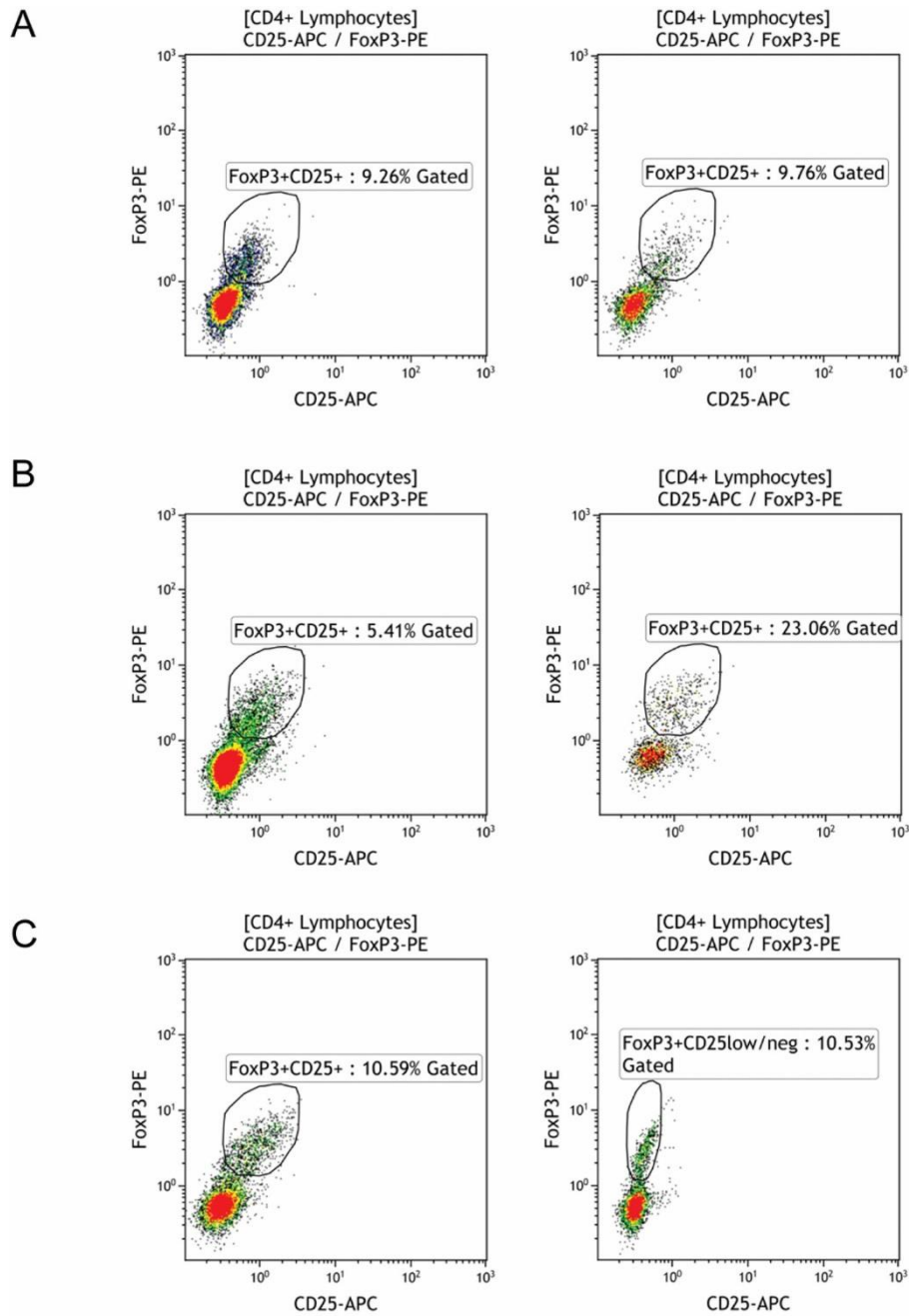
Předpokládá se, že regulační T lymfocyty (Treg) snižují autoimunitní odpověď. Cílem této otevřené prospektivní studie bylo zhodnotit efekt různé indukční léčby na Treg v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny a analyzovat asociaci počtů těchto buněk s krátkodobými výsledky transplantace.

Metody

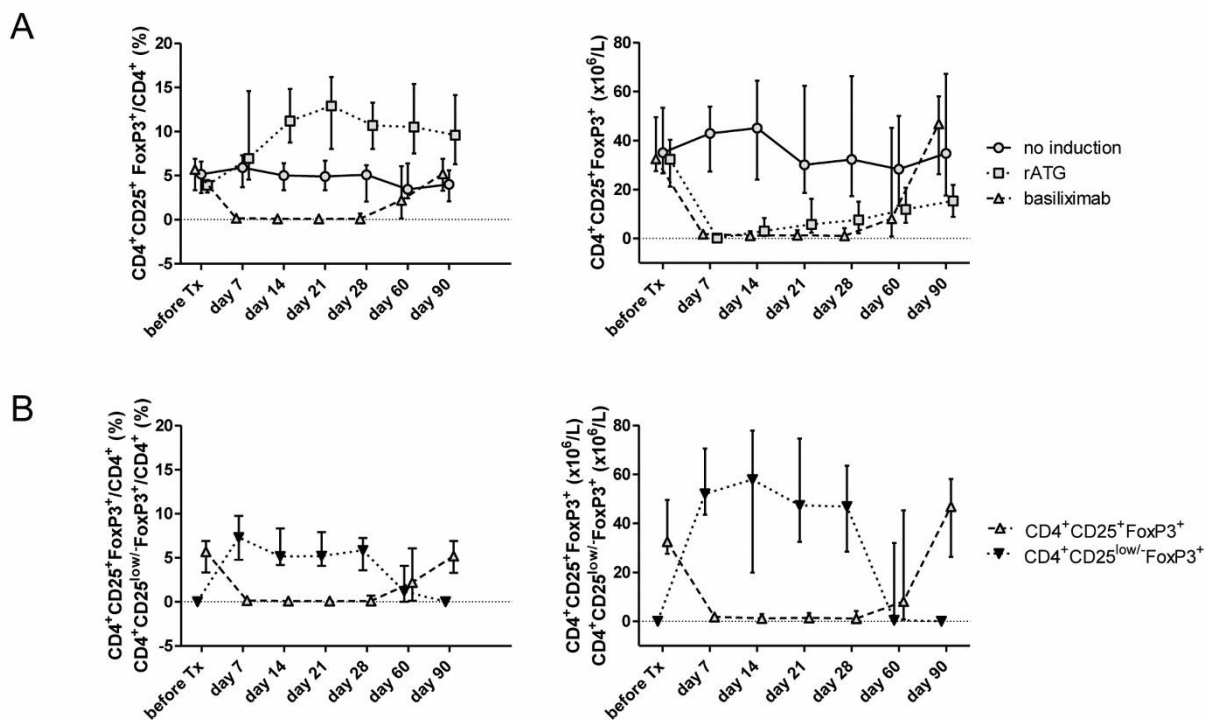
Počty CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg a CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ efektorových T lymfocytů (Teff) v periferní krvi byly stanovovány pomocí průtokové cytometrie u 71 prospektivně sledovaných příjemců ledvinného štěpu 0., 7., 14., 21., 28., 60. a 90. den po transplantaci. Pacienti byli léčeni trojkombinací imunosupresivní terapie s CNI s indukcí rATG (n=28), basiliximabem (anti-CD25 mAb, n=18) nebo bez indukce (n=25). Data z průtokové cytometrie byla korelována s incidencí rejekce.

Výsledky

V porovnání s pacienty léčených bez indukce, došlo ve skupině s indukcí rATG k expanzi CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ v rámci populace CD4⁺ T buněk ve všech sledovaných časech od 14. dne ($P < 0.001$). U pacientů léčených basiliximabem došlo v porovnání s pacienty bez indukce v období 7. až 60. den po transplantaci k signifikantnímu poklesu v počtech CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg ($P < 0.001$) a současně k přechodnému objevení CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ buněčné populace. Biopsicky potvrzená akutní rejekce se vyskytla u 16,7% pacientů bez indukce, 10,7% pacientů léčených rATG a u 11,1% pacientů léčených basiliximabem. U pacientů bez rejekce ve skupině s basiliximabem byl v potransplantačním období pozorován vyšší poměr CD4⁺FoxP3⁺ Treg / Teff.



Obrázek 5.1 Vliv různých indukčních imunosupresivních léků na Treg. (A) Reprezentativní bodový graf u pacienta, který byl léčen bez indukce, (B) u pacienta léčeného rATG a (C) pacienta léčeného basiliximabem před transplantací (vlevo) a 21. den po transplantaci (vpravo). Buňky byly sekvenčně gateovány na CD4⁺ a CD25⁺FOXP3⁺ populace. U pacientů s indukční léčbou basiliximabem byly buňky dodatečně gateovány na CD25^{low/neg}-FoxP3⁺ populaci (C vpravo).



Obrázek 5.2 Vliv různých indukčních imunosupresivních léků na Treg. (A) Časový průběh relativních (vlevo) a absolutních (vpravo) počtů CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg u pacientů, kteří nebyli léčeni indukční léčbou a u pacientů, léčených rATG či basiliximabem. (B) Časový průběh relativních (vlevo) a absolutních (vpravo) počtů CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ a CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ buněk ve skupině s basiliximabem. Data jsou zobrazena jako mediány a interkvartilová rozpětí.

Závěr a shrnutí studie

V této prospektivní studii jsme ukázali, že indukční léčba rATG byla asociována s expanzí CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulačních buněk a že léčba basiliximabem vedla k přechodnému objevení CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ buněk při současném přechodném vymizení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Pacienti léčení indukční imunosupresivní léčbou měli nižší výskyt rejekcí v porovnání s pacienty bez indukce. Trvale vyšší poměr CD4⁺FoxP3⁺/Teff byl asociovaný s nepřítomností rejekce po indukcí basiliximabem. Tyto nálezy naznačují možné další mechanismy podílející se na protirejekčním působení rATG a basiliximabu.

Práce byla publikována v časopise **Nephrology Dialysis and Transplantation**:

Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, Brabcova I, Girmanova E, Viklicky O. **Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy.** Nephrol Dial Transplant. 2012 Jun; 27(6):2576-82. Epub 2011 Dec 13. IF 3.371

Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy

Eva Krystuffkova¹, Alena Sekerkova², Ilja Striz², Irena Brabcova¹, Eva Girmanova¹ and Ondrej Viklicky^{1,3}

¹Transplant Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic, ²Department of Clinical and Transplant Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic and ³Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Correspondence and offprint requests to: Ondrej Viklicky; E-mail: ondrej.viklicky@medicon.cz

Abstract

Background. Regulatory T cells have been suggested to down-regulate the alloimmune response. The aim of this prospective open study was to evaluate the effects of different inductive agents on peripheral blood regulatory T cells in kidney transplant patients and to analyse their association with short-term graft outcome.

Methods. Regulatory and effector T cell numbers in peripheral blood were determined by flow cytometry in 71 prospectively followed kidney transplant recipients at postoperative day 0, 7, 14, 21, 28, 60 and 90. Patients were treated with a calcineurin inhibitor-based triple immunosuppression with polyclonal rabbit anti-thymocyte globulin (rATG, $n = 28$), basiliximab, the anti-CD25 monoclonal antibody ($n = 18$) or without induction (controls, $n = 25$). Flow cytometry data were correlated to rejection incidence.

Results. Compared to controls, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T-cell expansion among CD4⁺ T cells was noticed in the rATG group at all post-transplant time-points by Day 14 ($P < 0.001$). A significant decrease in Treg frequency ($P < 0.001$) and concurrently a transient increase of CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ population were observed in basiliximab-treated patients 7–60 days post-transplantation. Biopsy-proven acute rejection occurred in 16.7% of controls, 10.7% of the rATG group and in 11.1% of the basiliximab group. Higher CD4⁺FoxP3⁺/CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ ratios were observed repeatedly in those patients after basiliximab induction who were rejection free ($P < 0.01$).

Conclusions. In this study, the rATG induction therapy was associated with an expansion of regulatory cells. Sustained high CD4⁺FoxP3⁺/Teff ratios were associated with the absence of rejection after basiliximab induction.

Keywords: basiliximab; FoxP3; kidney transplantation; rATG; regulatory T cells

Introduction

Kidney transplants are the most effective method of treating end-stage renal disease. Following transplantation, it is recommended that induction therapies (lymphocyte-depleting agents including rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) or interleukin 2 receptor antagonist) be part of the initial immunosuppressive regimens implemented during the treatment of kidney transplant recipients as a means of reducing acute rejection and/or as a means of facilitating the use of reduced dosages of other immunosuppressive regimen components [1].

The mechanism whereby these inductive agents modulate alloimmune responses is not fully understood. Sakaguchi *et al.* [2] described CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in 1995 and Lopez *et al.* [3] demonstrated that rATG treatment expanded the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cell (Treg) population in a dose-dependent manner *in vitro*. These studies uncovered two mechanisms of expansion: conversion of CD4⁺CD25⁻ into CD4⁺CD25⁺ cells and proliferation of natural CD4⁺CD25⁺ T-cell populations.

The currently available interleukin 2 receptor antagonist is basiliximab, a monoclonal antibody with specificity to the IL-2 receptor α chain (IL-2R α , also known as CD25) present on the surface of activated T-lymphocytes. IL-2/IL-2 receptor (IL-2R) signalling plays a key role in the development and proliferation of antigen-activated T cells that include both effector T cells (Teff) and Tregs [4, 5].

Regulatory T cells have the potential of playing important roles in both the induction and maintenance of tolerance to donor alloantigens *in vivo* [6]. Circulating Tregs and the presence of FoxP3⁺ cells in the graft have also been associated with donor-specific hyporesponsiveness in patients after renal transplantation [7]. However, the Treg/Teff ratio could be more important than the number of Tregs present and it has been suggested that a disruption in the Treg/Teff ratio may be linked to graft outcome [8].

The aim of this study was to evaluate the effects of different inductive agents on peripheral regulatory T-cell

blood levels in kidney transplant recipients and to relate these levels to graft rejection.

Materials and methods

Patients and samples

Patients ($n = 71$) who received renal transplants from deceased donors at our centre between September 2009 and September 2010 were enrolled in this prospective observational study if they signed written informed consent, flow cytometry was available (weekdays) and patients were not receiving experimental immunosuppression. All patients received immunosuppression according to the centre protocol. Besides the standard triple maintenance therapy that consisted of a calcineurin inhibitor (either tacrolimus or cyclosporine A), mycophenolate mofetil and corticosteroids in the low-risk patients [panel reactive antibodies (PRA) <20%, control group, $n = 25$], patients received induction therapy in a case of higher immunological risk. Patients with PRAs $\geq 50\%$ or patients with previous renal transplantation received 1–1.5 mg/kg/day of rATG (rabbit anti-thymocyte globulin, Thymoglobulin®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA; $n = 28$) in two to seven doses during the first week post surgery. The median cumulative dose of rATG was 6.7 mg/kg (range 2.0–8.9 mg/kg). Patients with PRA 20–49% or those who received a kidney from an extended criteria donor were treated with 20 mg of basiliximab (Simulect®, Novartis, Basel, Switzerland; $n = 18$) on Days 0 and 4. Because the number of patients per group was intended to be similar, the time frame for patient recruitment into each group was different.

Except for a difference in the frequency of retransplantation, the mean percentage of PRA and donor age, the clinical characteristics did not differ significantly between the three groups (Table 1). Peripheral blood samples were collected at the following time-points: before transplantation and on Days 7, 14, 21, 28, 60 and 90 post-transplantation. Serum creatinine (Scr) levels, incidence of delayed graft function (DGF), estimated glomerular filtration rate (eGFR) (calculated using the MDRD₁ formula), proteinuria and incidence of acute rejection 3 months post-transplantation were recorded for all patients.

Written informed consent was obtained from all participants in addition to additional signed agreements obtained at the time each biopsy was performed. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (No.: 608-08-10).

A renal graft biopsy was obtained upon clinical presumption of acute rejection, such as an insufficient decline or sudden rise in serum creatinine levels and acute rejection diagnosed histologically according to the Banff '05 classification [9]. Borderline changes and T-cell-mediated rejection (TCMR) Grades I and IIA were treated by administering 1.5–2 g methylprednisolone, TCMR Grades IIB and III and steroid-resistant TCMR by administering rATG (10 dose; 2 mg/kg on Day 1 and 1 mg/kg for 2–10 days) and antibody-mediated rejection (AMR) by plasma exchange and intravenous immunoglobulin alternately during the 10-day period.

Three patients in the control group who received rATG for treatment of severe (steroid-resistant) acute rejection were excluded from group comparison statistics of flow cytometry data.

Flow cytometry and isolation of peripheral blood mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation over Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norway) from peripheral blood anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

PBMCs (100 μ L, approximately 1×10^6) were labelled with fluorochrome-conjugated (PE—phycoerythrin, PC7—phycoerythrin-cyanine 7, PC5—phycoerythrin-cyanine 5 or FITC—fluorescein) monoclonal antibodies diluted in phosphate-buffered saline–bovine serum albumin buffer for 20 min at room temperature in the dark. The specific antibody panels used consisted of either anti-CD4-PE (clone: 13B8.2), anti-CD8-PC7 (clone: SFC121Thy2D3), anti-CD62L-PC5 (clone: DREG56) and anti-CD45RA-FITC (clone: ALB11) or anti-CD4-PC7 (clone: SFC112T4D11), anti-CD25-PC5 (clone: B1.49.9) and anti-CD127-PE (clone: R34.34; Beckman Coulter, Brea, CA).

Intracellular FoxP3 staining of Tregs was performed as described by the manufacturer (Human Regulatory T Cell Staining Kit; eBioscience, San Diego, CA). Extracellular staining of freshly prepared and isolated PBMCs was carried out using anti-CD4-FITC (clone: RPA-T4) and anti-CD25-APC (clone: BC96) antibodies prior to intracellular staining with anti-Foxp3-PE (clone: PCH101). An appropriate isotype control monoclonal antibody (rat IgG2a-PE, cocktail of FITC and APC mouse IgG1) was used to establish the settings used for FoxP3⁺ Treg analysis.

Following staining, samples were analysed using an FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter) and C \times P and Kaluza software (Beckman Coulter). Measured T-cell subsets were defined as follows: Tregs as CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127⁻ and CD8⁺ T_H17 as

Table 1. Demographic characteristics at the time of transplantation^a

	No induction	rATG	Basiliximab	P-value			
Number	25	28	18				
Gender (male/female)	14/11	19/9	9/9	n.s. ^b			
Recipient age (years) ^c	57.9	[27.7; 73.3]	52.9	[21.5; 78.6]	n.s. ^d		
Donor age (years) ^c	52.0	[16.0; 68.0]	46.5	[22.0; 74.0]	63.5	[46.0; 75.0]	<0.001 ^{d,e}
HLA MM ^c	3	[1; 6]	4	[2; 5]	4	[1; 5]	n.s. ^d
1st/2nd and 3rd T \times R (n)	25/0	12/16 ^f	18/0				<0.0001 ^b
PRA (%) ^c	4	[0; 36]	64	[0; 96]	7	[0; 44]	<0.0001 ^{d,g}
CNI (TAC/CsA) (n)	21/4	28/0	18/0				n.s. ^b
CIT (hours) ^c	15.2	[11.0; 20.7]	15.9	[7.7; 22.8]	17.6	[12.4; 21.0]	n.s. ^d
Dialysis time (years) ^c	2.0	[0.2; 9.42]	2.2	[0.5; 6.37]	2.1	[0; 4.9]	n.s. ^d
Cause of renal failure							n.s.
Primary GN	10	10	5				
Hereditary diseases	4	6	6				
Diabetic or ischaemic nephropathy	8	2	5				
TIN	2	3	1				
ANCA vasculitis or lupus nephritis	0	4	0				
Other causes	1	3	1				

^aANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; CIT, cold ischaemic time; CNI, calcineurin inhibitor; CsA, cyclosporine A; GN, glomerulonephritis; HLA MM, HLA mismatch; PRA, historical panel reactive antibodies, measured every 3 months before transplantation, the highest number was considered in each patient; TAC, tacrolimus; TIN, tubulointerstitial nephritis; T \times , renal transplantation.

^bChi square test P-value.

^cMedian [min; max].

^dKruskal–Wallis test P value.

^eDunn's multiple comparison test: significant difference between the basiliximab group and the rATG or controls.

^fTwo patients had a third transplantation.

^gDunn's multiple comparison test: significant difference between rATG and the no induction or basiliximab groups.

CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻. Flow cytometric analyses were performed with at least 100 gated events.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) and BMDP PC-90 statistical software (BMDP Statistical Software Inc., Los Angeles, CA). Based on the distribution of the data (Shapiro–Wilk's test for normality), we performed parametric or non-parametric (Mann–Whitney, Kruskal–Wallis) tests. For analysis of categorical variables, chi-square test was used. We performed logarithmic transformation and parametric testing by repeated measures analysis of variance with Bonferroni's post-test correction when comparing flow cytometry data between the three groups at different time-points. Clinical and flow cytometry data were correlated using the Spearman rank correlation coefficient. Differences were regarded as statistically significant with $P < 0.05$. Data are expressed as median values and [min; max] or interquartile range based on their distribution.

Results

Patient and graft survival

From a total of 71 patients, three patients underwent graft nephrectomy (Day 4, 20 and 58 after transplantation) for renal vein thrombosis, acute haemorrhage after biopsy or primary non-functional graft, respectively; 2 patients died on Days 56 and 80 of sudden death and pulmonary artery embolism, respectively. Two patients withdrew their informed consent to participate in the study at Days 14 and 60.

Graft function

The three patient groups examined did not differ in their incidence rates of DGF: controls: 8/25 (32%); the rATG group: 7/28 (25%) and the basiliximab group: 9/18 (50%). No significant differences in the levels of SCr, eGFR and proteinuria were observed, respectively, between treatment groups 90 days post-transplantation: controls, 127 [61; 314] $\mu\text{mol/L}$, 0.76 [0.19; 1.46] mL/s/1.73 m^2 and 0.22 [0.07; 2.18] g/24 h ; rATG, 120 [57; 239] $\mu\text{mol/L}$, 0.78 [0.29; 1.57] mL/s/1.73 m^2 and 0.18 [0.10; 2.15] g/24 h and basiliximab, 153 [79; 278] $\mu\text{mol/L}$, 0.59 [0.28; 1.10] mL/s/1.73 m^2 and 0.28 [0.07; 0.49] g/24 h .

Graft rejection

Acute rejection occurred during the first 3 months in 4/24 (16.7%) control group patients, 3/28 (10.7%) rATG patients and in 2/18 (11.1%) basiliximab-treated patients ($P > 0.05$). There were another five patients with borderline changes in the control group and seven were treated with basiliximab.

In patients without induction therapy, two patients suffered from early acute TCMR, one patient from acute AMR and one patient had a combined type of rejection. In patients with rATG induction, three patients suffered from AMR and in those with basiliximab, one patient suffered from early acute TCMR and one from combined acute TCMR and AMR.

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells

Tregs were defined as CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127⁻ cells. When median values were plotted at each time-point examined, we observed a parallel

course in the cell numbers present within each group (data not shown). Pre-transplant levels of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127⁻ were 4.5 [1.5; 11.2]% and 5.7 [2.0; 11.6]% of the total CD4⁺ cell counts, respectively. The differences observed between Treg populations was due to the narrow gating of the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cell population carried out with the aim of obtaining maximal purity of this population. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cell frequencies are further described below.

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg levels post rATG treatment

We observed a depletion in Tregs, as well as in other T-cell subpopulations (data not shown), in patients treated with rATG by Day 7, followed by a slow expansion in Tregs over the 3-month post-transplantation examination period. Treg numbers decreased at Day 7 compared to pre-transplant values and reached 47% of their initial levels by Day 90 (Day 0: 32.3 [1.2; 94.4] $\times 10^9/\text{L}$; Day 7: 0.2 [0.01; 8.6] $\times 10^9/\text{L}$; Day 90: 15.3 [4.0; 35.9] $\times 10^9/\text{L}$; Figure 2A).

Treg frequencies in rATG-treated patients increased at Day 7 compared to pre-transplant values and remained high until Day 90 (Day 0: 3.9 [1.6; 9.1]%, Day 7: 7.0 [2.4; 22.3]% and Day 90: 9.6 [2.9; 23.7]%). Treg frequencies were higher at all post-transplant time-points examined compared to controls and were significantly elevated from Day 14 (Day 7: $P > 0.05$; Day 14–90: $P < 0.001$; Figures 1 and 2A). To evaluate the dose dependence of rATG on Treg frequencies, we correlated the cumulative doses of rATG used and the Treg frequencies observed at each post-transplant time-point. No significant correlations were found.

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg and CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ levels post basiliximab

In the basiliximab group, we observed a decrease in both the absolute and relative numbers of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells at Day 7, which remained low until Day 60 and then rose to pre-transplant levels by Day 90 (Day 0: 32.5 [10.5; 133.1] $\times 10^9/\text{L}$ and 5.7 [1.7; 11.2]%, Day 7: 1.8 [0.4; 5.1] $\times 10^9/\text{L}$ and 0.2 [0.1; 1.1]%, Day 90: 46.8 [7.7; 88.9] $\times 10^9/\text{L}$ and 5.2 [2.4; 10.0]%; Figure 2A). We observed a significantly lower proportion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells between Days 7–60 ($P < 0.001$) and no differences at Day 90 compared to the control group (Figure 2A).

On the contrary, a CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ population appeared 7 days post-transplantation whose density reached higher levels than pre-transplant values for CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells in both relative and absolute numbers; remaining detectable in all patients until Day 28, in half of the patients by Day 60 and in no patients by Day 90. The disappearance of the CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ cell population was in accordance with the reconstitution of the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-cell population (Figures 1C and 2B).

The CD4⁺FoxP3⁺/CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ ratio and acute rejection

To define the ratio between regulatory and CD8⁺ effector T cells in the whole patient cohort, the CD4⁺FoxP3⁺/T

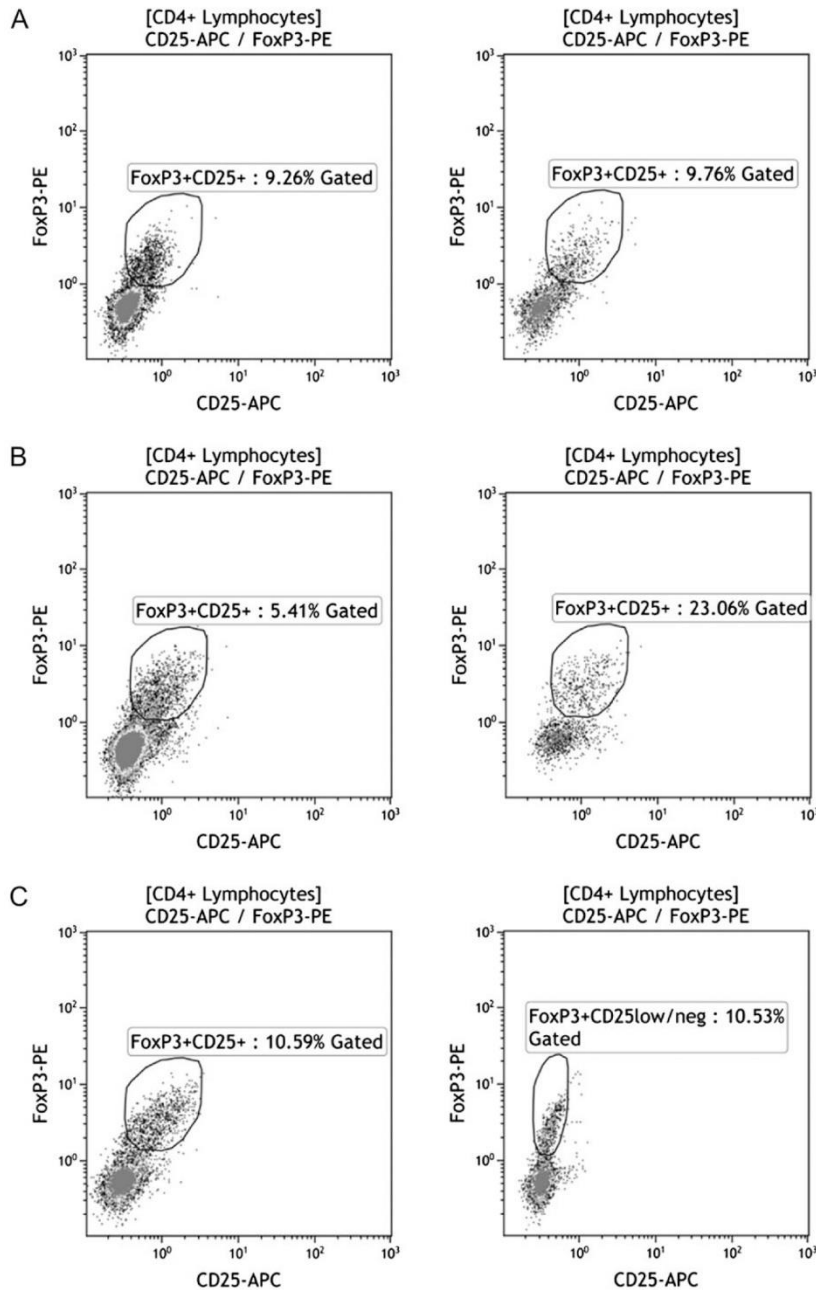


Fig. 1. Effect of different inductive agents on Treg cells. (A) Representative dot plots of a patient who received no induction, (B) a patient treated with rATG and (C) a patient treated with basiliximab from Day 0 (left) to 21 (right); CD4⁺ cells were stained for CD25 and FoxP3 and gated for CD25⁺FoxP3⁺ cells. Cells from basiliximab-treated patients were additionally gated for CD25^{low/neg}-FoxP3⁺-expressing cells.

effector (CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻, Teff) ratio was calculated. The CD4⁺FoxP3⁺/Teff ratio values in the rATG group were significantly higher beginning 14 days post-transplantation ($P < 0.001$) compared to controls. There were not any significant differences in the CD4⁺FoxP3⁺/Teff ratio between the basiliximab group and controls (data not shown).

We assessed a possible association of peripheral regulatory and effector T cells with biopsy-proven acute rejection.

There were no significant differences in CD4⁺FoxP3⁺ frequencies, Teff frequencies and CD4⁺FoxP3⁺/Teff ratios between patients without and with acute rejection in control group (without induction therapy) and in those receiving rATG induction at all time-points ($P > 0.05$; Figure 3). Interestingly, patients without induction therapy who experienced steroid-resistant rejection had higher pre-transplant effector T-cell proportion than the patient with steroid-sensitive rejection (44.9% versus 9.1%).

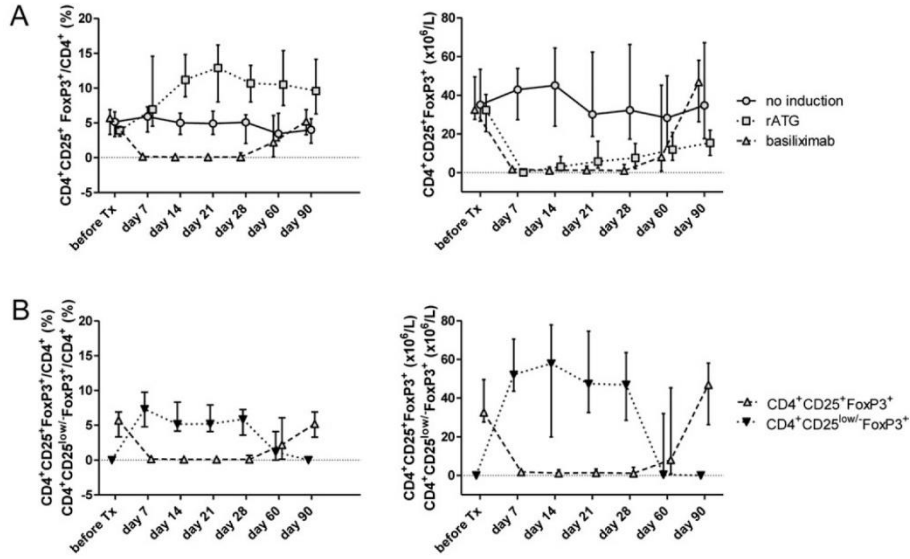


Fig. 2. Effect of different inductive agents on Treg cells. (A) The time course of relative (left) and absolute (right) numbers of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs in patients who did not receive induction and patients in the rATG and basiliximab groups. Data are expressed as median values and interquartile range. (B) The time course of relative (left) and absolute (right) numbers of $CD4^+CD25^{low/-}FoxP3^+$ and $CD4^+CD25^{low/-}FoxP3^+$ -stained cells in the basiliximab group. Data are expressed as median values and interquartile range.

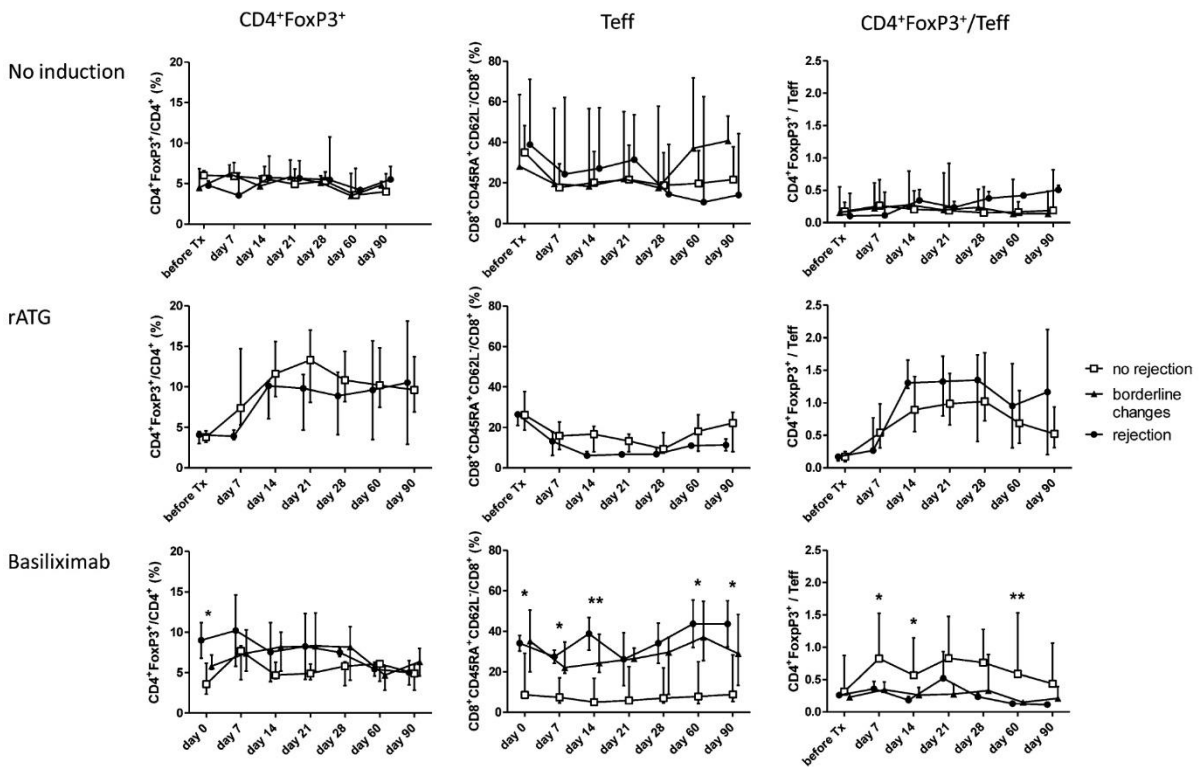


Fig. 3. The distribution of T-cell subpopulations and $CD4^+FoxP3^+/Teff$ ratio according to acute rejection occurrence. Data of patients without induction therapy (controls) who experienced steroid-resistant rejections and were treated with rATG are included. Data are expressed as median values and interquartile range. Asterisks mark statistical significances—(*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$.

In patients receiving basiliximab induction therapy, the $CD4^+FoxP3^+$ and Teff frequencies and $CD4^+FoxP3^+/Teff$ ratios were similar in patients with acute rejection and in

those with borderline changes ($P > 0.05$; Figure 3). Sustained lower Teff frequencies and higher $CD4^+FoxP3^+/Teff$ ratios were observed in patients without acute rejection as

compared to patients who experienced either acute rejection or borderline changes (Figure 3). There were significantly lower pre-transplant CD4⁺FoxP3⁺ and Teff frequencies in rejection-free patients compared to patients with either acute rejection or borderline changes ($P < 0.05$, Figure 3).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first prospective trial that has evaluated the effects of different induction agents on regulatory T cell profiles in the kidneys of transplant patients *in vivo*. In this study, we analysed the nature of the T-cell subpopulations present and correlated them to clinical data in patients post-renal transplantation that were treated with two different inductive agents: rATG or basiliximab. We demonstrated that rATG increased the proportion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs and that basiliximab caused a decrease in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs (and a transient appearance in CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ cells). Moreover, the balance between regulatory and effector cells was associated with early acute kidney allograft rejection in basiliximab-treated patients.

Data presented in this study demonstrated that rATG- and basiliximab-treated patients had a decreased acute rejection incidence. This observation is in line with many other studies where rATG induction was associated with reduced acute rejection incidence and improved kidney graft survival [10]. Sufficient evidence suggests that a net benefit effect of anti-IL2-RA treatment compared to placebo (for outcomes in some patients) and a high-quality net benefit in preventing acute rejection [1]. Less is known about the mechanism of action associated with both depletive and non-depletive induction agents.

In this study, we observed *in vivo* depletion in the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cell compartment following rATG treatment as reported previously [11] but the proportion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells from CD4⁺ cells was clearly increased. The rise in the relative numbers of Tregs suggested that rATG induced the expansion of these cells as previously described *in vitro* by Lopez *et al.* [3] and Sewgobind *et al.* [12]. Our observations were consistent with recently published data by Gurkan *et al.* [13] who described both the peripheral expansion and new thymic emigration of T cells with the Treg phenotype induced by 6 mg/kg rATG. *In vitro* studies [3, 12, 14] demonstrated a dose-dependent increase in the proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells using lower rATG concentrations (between 1 and 10 µg/mL or 50 µg/mL) and increased activation (and a decline in the expansion) of CD4⁺CD25⁺ T cells at higher concentrations (50–100 µg/mL or 100 µg/mL) with 10 µg/mL being the optimum concentration for expansion. Serum levels of rATG ranged from 50 to 100 µg/L in clinical conditions [15]. However, levels in lymphoid tissues may be lower, allowing for Treg expansion. Both *in vitro* [3, 12, 14] and *in vivo* [11] data demonstrated that rATG affected CD4⁺CD25⁺ T cells numbers but did not affect their function.

Furthermore, we observed a transient rise in CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ T cells in patients in the basiliximab group consistent with results described by both Wang *et al.* [16] and Vondran *et al.* [17] who demonstrated a

down-regulation in CD25 expression following basiliximab induction therapy. Both authors showed that basiliximab did not interfere with the suppressive function of Tregs. Chen *et al.* [18] showed that CD4⁺FoxP3⁺ T cells could be generated from peripheral CD4⁺CD25⁻ naive responder cells following co-stimulation of the T cell receptor; TGF-β1 combined with Transforming growth factor-β1 signalling in the absence of IL-2. De Goer de Herve *et al.* [19] suggested that human Treg peripheral cells could be maintained *in vivo* as a consequence of IL-2Rβγ/IL-2 interaction in basiliximab-mediated IL-2Rα blockage.

Nevertheless, basiliximab has also been shown to hinder CD25 detection using certain fluorochrome-conjugated antibodies that bind a common CD25 epitope [20]. Therefore, reductions in Treg cell populations could be overrepresented in the presence of a competing anti-CD25 monoclonal antibody used for detection using flow cytometry. Abadja *et al.* [21] examined the most commonly used anti-CD25 antibody clones used for detection in flow cytometric applications and showed that 6/8 clones interfered with basiliximab thereby resulting in improper staining of the CD25⁺ population. In our study, clones that interfered with basiliximab were used.

It has been broadly suggested that the imbalance in the Treg/Teff ratio may be linked to graft outcome [8]. In our experiment, we confirm this observation in patients after basiliximab induction only. This may be explained by the fact that all acute rejections that occurred in patients after rATG induction were surprisingly antibody mediated. Our previous research suggested differences in immune regulation in AMR and TCMR [22]. Similarly, microarray studies revealed quantitatively specific molecules and pathogenesis-based transcript sets in TCMR and AMR of kidney transplants [23]. These results are in line with the observation of accelerated rejection despite high FoxP3⁺ T-cell infiltration in a rodent model. This experiment suggests effector T cells that have undergone homeostatic proliferation after induced lymphopenia to have augmented functional capabilities and to behave similarly to memory T cells that are resistant to regulation by regulatory T cells [24]. Similarly, the application of rATG was shown to spare the central memory and effector memory T cells in the early post-transplant period [13].

In our study, we observed a trend towards higher pre-transplant effector T-cell proportion in induction-free patients who experienced severe steroid-resistant rejection. This observation may be supported by others where a high proportion of pre-transplant effector T cells were associated with unfavourable outcome [25] but unspecific effector T-cell frequencies may be associated with chronic inflammation that is frequent in dialysed patients. The evaluation of memory T cells by the Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) technique seems to be more feasible to detect alloreactivity at the time of transplantation.

Our measurements showed a parallel course of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127⁻ cells which is in agreement with published data of Liu *et al.* [26], who showed that CD127 expression inversely correlated with FoxP3 expression and that the overwhelming majority of CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} cells expressed FoxP3. In contrast, Klein *et al.* [27] showed that a high frequency

of CD127^{low/-} cells did not express FoxP3 and, conversely, that there was a high proportion of FOXP3-expressing CD127⁺ cells in healthy individuals, suggesting that these markers did not represent the same population of Tregs.

A limitation of our study was the inability to define different Treg subtypes as well as to distinguish regulatory T cells from activated T cells transiently expressing FoxP3. This could be possibly overcome by using a more detailed phenotyping approach or by assessing the demethylation status of the FOXP3 gene. However, those experiments were beyond the scope of this study. Similarly, the feasibility of the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cell monitoring as biomarker of the efficacy of induction therapy has remained speculative. Firstly, precise and validated tests of alloimmune reactivity and tolerance must be available before the larger biomarker-driven clinical trials can explore its clinical usefulness.

In conclusion, we demonstrated *in vivo* that rATG increased the proportion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs and that basiliximab caused a transient appearance of CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ cells along with a decrease in CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs. Patients treated with induction therapy had a lower incidence of rejection compared to controls. Sustained high CD4⁺FoxP3⁺/Teff ratios were associated with the absence of acute rejection in patients after basiliximab induction.

Acknowledgements. This study was supported by a grant from the Internal Grant Agency from the Ministry of Health of the Czech Republic No.: IGA MZCR NS 10517-3/2009 and by the Grant Agency of the Czech Republic, grant No.: P301/11/1568. The authors are indebted to Janka Slatinska, Romana Polackova, Martina Ondrakova, Katarina Barcikova, Eva Faberova, Adela Sajdlova and Jelena Skibova for their technical assistance and coordination of the sample collection as well as to the patients and nurses for their cooperation and help.

Conflict of interest statement. O.V. received lecture fees from Genzyme and Novartis and a research grant from Novartis.

(See related article by Heemann. The impact of regulatory T cells in acute rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 2145–2146.)

References

- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009; 9 (Suppl 3): S1–S155
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–1164
- Lopez M, Clarkson MR, Albin M *et al.* A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2844–2853
- Sadlack B, Merz H, Schorle H *et al.* Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993; 75: 253–261
- Malek TR, Yu A, Vincek V *et al.* CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002; 17: 167–178
- Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199–210
- Braudeau C, Racape M, Giral M *et al.* Variation in numbers of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int* 2007; 20: 845–855
- Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Domenig C *et al.* The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol Rev* 2003; 196: 75–84
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC *et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518–526
- Thibaudin D, Alamartine E, de Filippis JP *et al.* Advantage of antithymocyte globulin induction in sensitized kidney recipients: a randomized prospective study comparing induction with and without antithymocyte globulin. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 711–715
- Sewgobind VD, Kho MM, van der Laan LJ *et al.* The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1635–1644
- Sewgobind VD, van der Laan LJ, Kho MM *et al.* Characterization of rabbit antithymocyte globulins-induced CD25⁺ regulatory T cells from cells of patients with end-stage renal disease. *Transplantation* 2010; 89: 655–666
- Gurkan S, Luan Y, Dhillon N *et al.* Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant* 2010; 10: 2132–2141
- Feng X, Kajigaya S, Solomou EE *et al.* Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells *in vitro*. *Blood* 2008; 111: 3675–3683
- Lowsky R, Takahashi T, Liu YP *et al.* Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2005; 353: 1321–1331
- Wang Z, Shi BY, Qian YY *et al.* Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2009; 155: 496–503
- Vondran FW, Timrott K, Tross J *et al.* Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation. *Transpl Int* 2010; 23: 514–523
- Chen W, Jin W, Hardegen N *et al.* Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875–1886
- de Goer de Herve MG, Gonzales E, Hendel-Chavez H *et al.* CD25 appears non essential for human peripheral T(reg) maintenance *in vivo*. *PLoS One* 2010; 5: e11784
- Vincenti F, Lantz M, Birnbaum J *et al.* A phase I trial of humanized anti-interleukin 2 receptor antibody in renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 33–38
- Abadja F, Alamartine E, Berthoux F *et al.* Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation* 2010; 89: 366–368
- Viklicky O, Hribova P, Volk HD *et al.* Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 173–180
- Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G *et al.* The molecular phenotype of kidney transplants. *Am J Transplant* 2010; 10: 2215–2222
- Moxham VF, Karegli J, Phillips RE *et al.* Homeostatic proliferation of lymphocytes results in augmented memory-like function and accelerated allograft rejection. *J Immunol* 2008; 180: 3910–3918
- Egawa H, Ozawa K, Takada Y *et al.* Impact of preexisting circulating effector T cells on the outcome of ABO-incompatible adult LDLT. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2253–2263
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701–1711
- Klein S, Kretz CC, Krammer PH *et al.* CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 492–499

Received for publication: 20.6.11; Accepted in revised form: 2.11.11

5.2. Vliv indukční imunosuprese na expresi genů asociovaných s tolerancí a rejekcí

Úvod

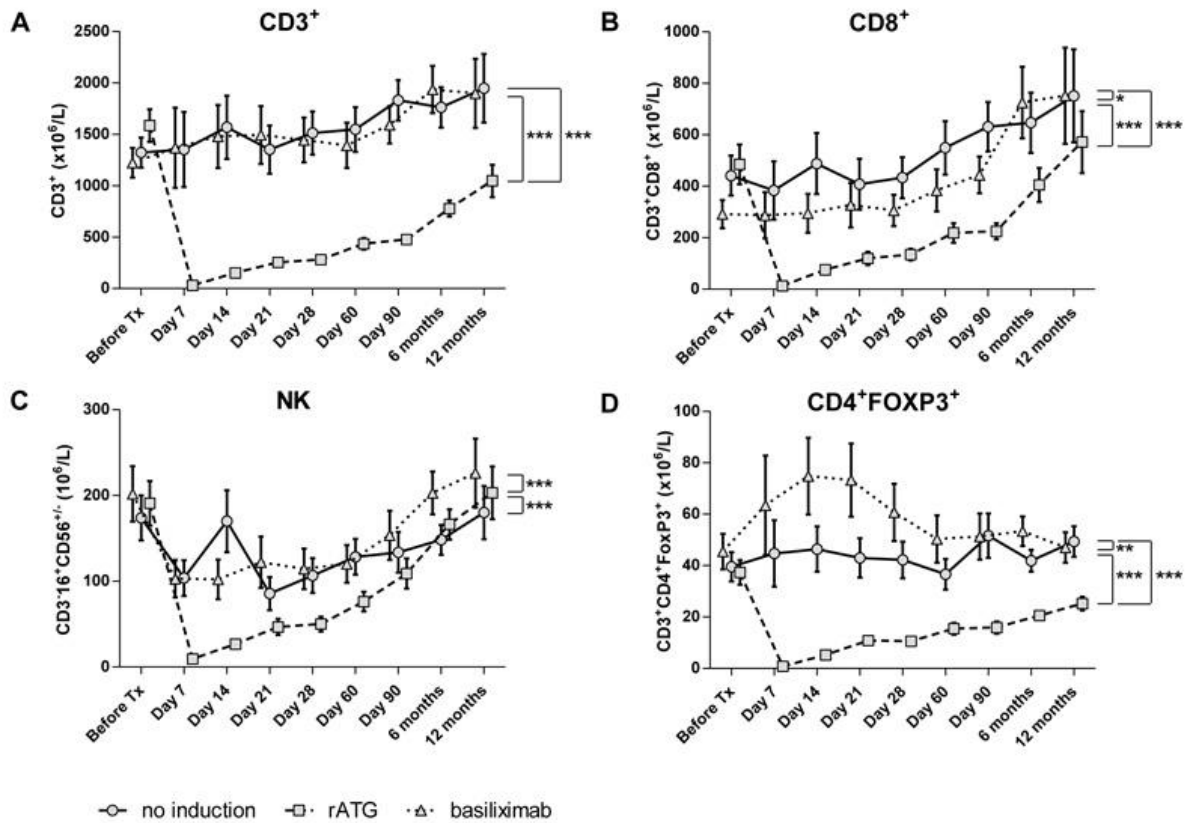
Indukční terapie může zlepšit výsledky renální transplantace, ale jen málo je známo o mechanismech zodpovědných za její efekt. Cílem této studie bylo zhodnotit efekt různé indukční léčby na expresi genů asociovaných s tolerancí či rejekcí a počty lymfocytárních subpopulací v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny.

Metody

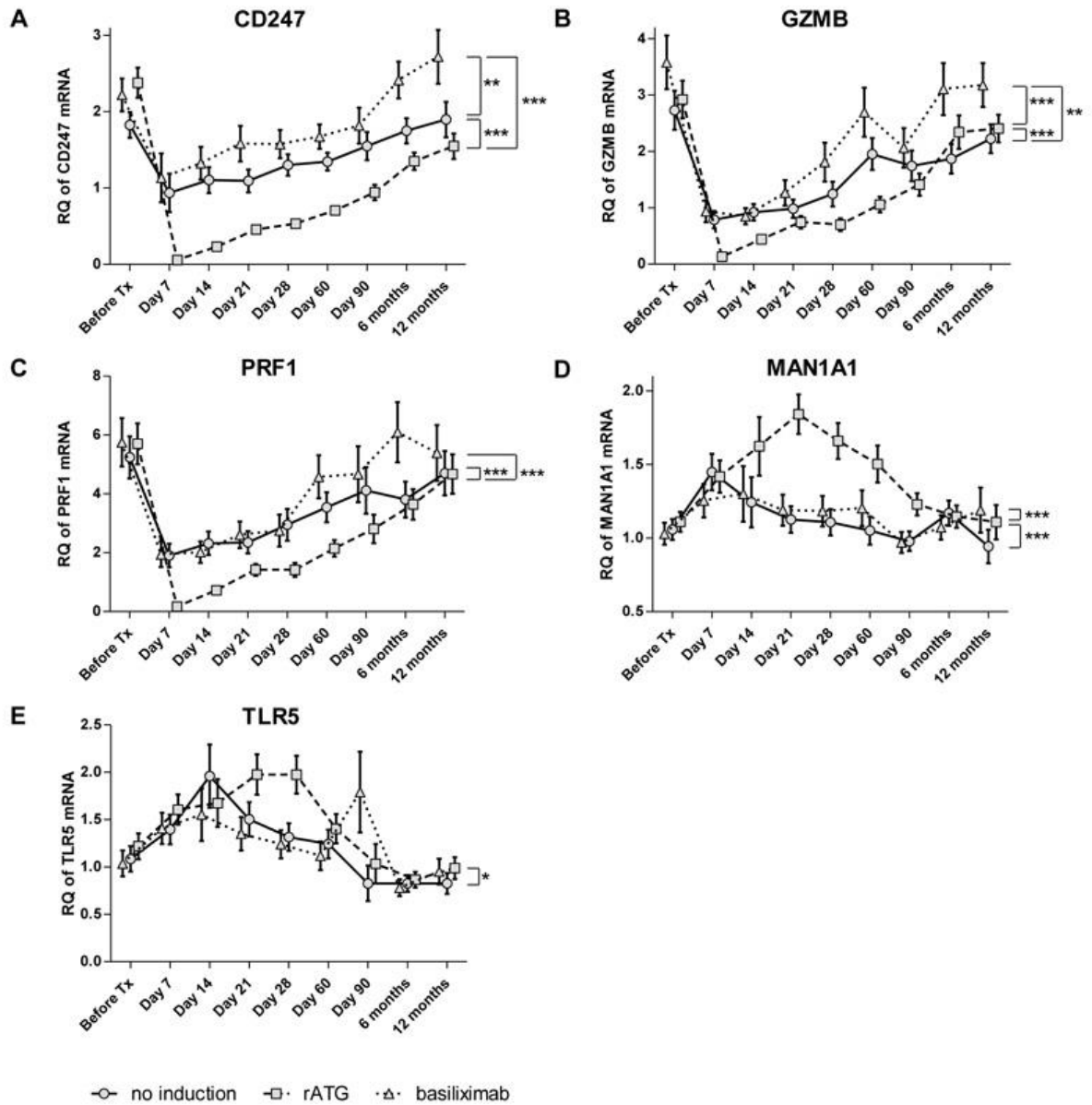
V periferní krvi 60 příjemců transplantované ledviny byla prospektivně monitorována relativní množství (RQ) mRNA genů asociovaných s tolerancí nebo rejekcí (*CD247*, *GZMB*, *PRF1*, *FOXP3*, *MAN1A1*, *TCAIM*, a *TLR5*) a lymfocytární subpopulace (CD3⁺, CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty, CD4⁺FoxP3⁺ Treg a NK buňky) před transplantací a 7., 14., 21., 28., 60., 90. den a 6. a 12. měsíc po transplantaci. Protože basiliximab může vést k down-regulaci znaku CD25 (Vondran *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009) nebo interferovat s některými klony anti-CD25 mAb užívaných pro průtokovou cytometrii (Abadja *et al.*, 2010), byly v této studii Treg definovány jako CD4⁺FoxP3⁺. Pacienti byli léčeni trojkombinační imunosupresí založené na CNI a indukci rATG (n=24) či basiliximabem (n=17) nebo bez indukce (n=19). Pro statistickou analýzu byl použit zobecněný smíšený lineární model pro opakovaná měření s adjustací na rejekci, věk dárce a příjemce a opožděný rozvoj funkce.

Výsledky

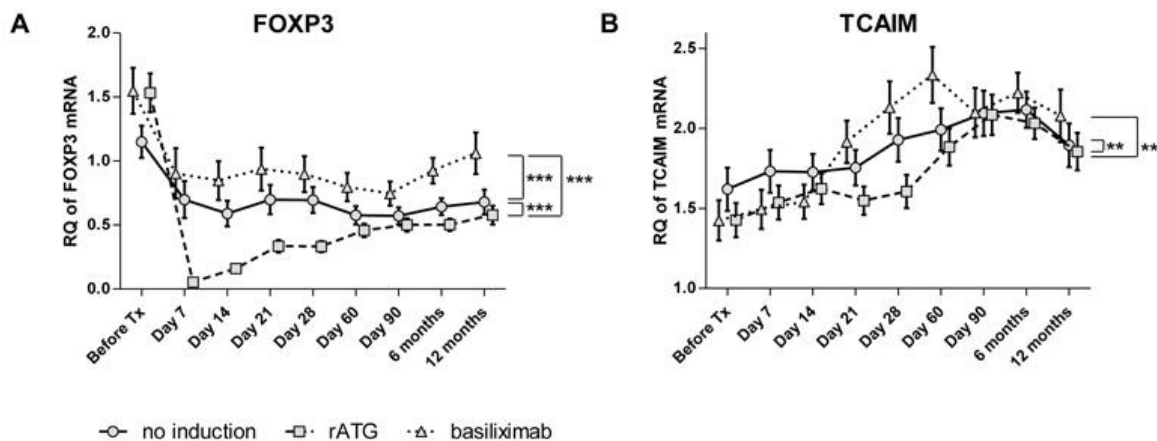
Indukční léčba rATG vedla k depleci všech sledovaných T buněčných subpopulací a NK buněk během 7 dní po podání. Následovala pomalá repopulace během 12-měsíčního sledování. Stejně tak byl po rATG pozorován pokles hladin exprese genů *CD247*, *FOXP3*, *GZMB* a *PRF1* během 7 dní po transplantaci s následným vzestupem směrem k předtransplantačním hodnotám. Ve skupině s indukci basiliximabem byly pozorovány vyšší exprese genů *CD247*, *GZMB*, *FOXP3* a *TCAIM* a vyšší počty CD4⁺FoxP3⁺ Treg než ve skupině bez indukce. Ve skupině s indukční léčbou rATG byly pozorovány vyšší exprese genů *MAN1A1* a *TLR5*, zatímco exprese genu *TCAIM* byly v této skupině nižší v porovnání se skupinou pacientů bez indukce.



Obrázek 5.3 Vliv různé indukční imunosupresivní terapie na absolutní počty T a NK lymfocytů v periferní krvi příjemců transplantované ledviny během jednoročního sledování. Absolutní počty T lymfocytů (CD3⁺, **A**), CD8⁺ T lymfocytů (**B**), NK buněk (**C**) a CD4⁺FOXP3⁺ Treg (**D**) byly analyzovány průtokovou cytometrií v periferní krvi pacientů léčených rATG (čtverce na čárkované čáře), basiliximabem (trojúhelníky na tečkované čáře) nebo bez indukce (kroužky na plné čáře). Data jsou vyjádřena jako odhadnuté marginální průměry ± SEM.



Obrázek 5.4 Vliv různé indukční imunosupresivní terapie na expresi transkriptů asociovaných s rejekcí v periferní krvi příjemců transplantované ledviny během jednorozhodného sledování. Relativní množství (RQ) mRNA genu CD247 (A), GZMB (B), PRF1 (C), MAN1A1 (D) a TLR5 (E) byla analyzována pomocí qRT-PCR v periferní krvi pacientů léčených rATG (čtverce na čárkované čáře), basiliximabem (trojúhelníky na tečkované čáře) nebo bez indukce (kroužky na plné čáře). Data jsou vyjádřena jako odhadnuté marginální průměry ± SEM.



Obrázek 5.5 Vliv různé indukční imunosupresivní terapie na expresi transkriptů asociovaných s tolerancí v periferní krvi příjemců transplantované ledviny během jednoročního sledování. Relativní množství (RQ) mRNA genu *FOXP3* (A) a *TCAIM* (B) byla analyzována pomocí qRT-PCR v periferní krvi pacientů léčených rATG (čtverce na čárkované čáře), basiliximabem (trojúhelníky na tečkované čáře) nebo bez indukce (kroužky na plné čáře). Data jsou vyjádřena jako odhadnuté marginální průměry ± SEM.

Závěr a shrnutí studie

V této otevřené prospektivní studii byla indukční léčba rATG krátce po transplantaci spojena s poklesem transkriptů asociovaných s T a NK buňkami a s up-regulací dvou transkriptů asociovaných s rejekcí (*MAN1A1* a *TLR5*). Vyšší exprese rejekčních genů, které jsou exprimovány i jiným buňkami než jsou lymfocyty podléhající depleci rATG, mohou ve skupině s rATG léčbou odrážet již předtransplatačně zvýšené riziko rejekce u těchto pacientů. Indukční léčba basiliximabem byla asociována se zvýšením absolutních počtů CD4⁺FoxP3⁺ regulačních T buněk a vyšší hladinou exprese genů dvou genů asociovaných s tolerancí, *FOXP3* a *TCAIM*, což může naznačovat protektivní potenciál léčby basiliximabem.

Práce byla publikována v časopise **BMC Nephrology**:

Krepsova E, Tycova I, Sekerkova A, Wohlfahrt P, Hrubá P, Striz I, Sawitzki B and Viklicky O. **Effect of induction therapy on the expression of molecular markers associated with rejection and tolerance.** BMC Nephrol. 2015 Aug 19;16:146. IF 1.690

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Effect of induction therapy on the expression of molecular markers associated with rejection and tolerance

Eva Krepsova¹, Irena Tycova¹, Alena Sekerkova², Peter Wohlfahrt³, Petra Hrubá¹, Ilja Striz², Birgit Sawitzki⁴ and Ondrej Viklicky^{1,5,6*}

Abstract

Background: Induction therapy can improve kidney transplantation (KTx) outcomes, but little is known about the mechanisms underlying its effects.

Methods: The mRNA levels of T cell-related genes associated with tolerance or rejection (*CD247*, *GZMB*, *PRF1*, *FOXP3*, *MAN1A1*, *TCAIM*, and *TLR5*) and lymphocyte subpopulations were monitored prospectively in the peripheral blood of 60 kidney transplant recipients before and 7, 14, 21, 28, 60, 90 days, 6 months, and 12 months after KTx. Patients were treated with calcineurin inhibitor-based triple immunosuppression and induction with rabbit anti-thymocyte globulin (rATG, $n = 24$), basiliximab ($n = 17$), or without induction (no-induction, $n = 19$). A generalized linear mixed model with gamma distribution for repeated measures, adjusted for rejection, recipient/donor age and delayed graft function, was used for statistical analysis.

Results: rATG treatment caused an intense reduction in all T cell type population and natural killer (NK) cells within 7 days, then a slow increase and repopulation was observed. This was also noticed in the expression levels of *CD247*, *FOXP3*, *GZMB*, and *PRF1*. The basiliximab group exhibited higher *CD247*, *GZMB*, *FOXP3* and *TCAIM* mRNA levels and regulatory T cell (Treg) counts than the no-induction group. The levels of *MAN1A1* and *TLR5* mRNA expressions were increased, whereas *TCAIM* decreased in the rATG group as compared with those in the no-induction group.

Conclusion: The rATG induction therapy was associated with decreased T and NK cell-related transcript levels and with upregulation of two rejection-associated transcripts (*MAN1A1* and *TLR5*) shortly after KTx. Basiliximab treatment was associated with increased absolute number of Treg cells, and increased level of *FOXP3* and *TCAIM* expression.

Keywords: Basiliximab, *FOXP3*, Kidney transplantation, rATG, Rejection, Tolerance

Summary

In a prospective open study, rATG induction therapy was associated with profound decreases of T and NK cell-related transcripts and with the upregulation of two rejection-associated transcripts (*MAN1A1* and *TLR5*) in the early post-KTx period. Basiliximab induction was associated with increased absolute number of Treg cells,

and increased expression of tolerance associated markers *FOXP3* and *TCAIM*.

Background

Long-term allograft survival requires lifelong immunosuppression, the use of which could be accompanied by several side effects [1]. For many patients triple drug regimens are not necessary due to weak alloreactive responses. Therefore, a development of reliable tests that may help identify patients suitable for drug minimization or at risk for rejection is needed. Several markers of rejection or operational tolerance (defined as good and

* Correspondence: ondrej.viklicky@ikem.cz

¹Transplant Laboratory, Centre for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁵Department of Nephrology, Transplant Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958, 14021 Prague, Czech Republic
Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Krepsova et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

stable graft function in immunosuppression free patients) have been identified [2–8].

Granzyme B (*GZMB*) and perforin (*PRF1*) are effector molecules produced by cytotoxic T and natural killer (NK) cells. Perforin forms a pore in the target cell membrane and thus facilitates the entry of granzyme B and other compounds into the cell which subsequently leads to apoptosis [9]. The urine and peripheral blood transcript levels of *PRF1* and *GZMB* were shown to be increased in kidney transplant recipients with acute rejection [2, 3]. The ζ -chain of T cell receptor (*CD247*) is a part of T-cell receptor-CD3 complex on T cells and activating receptors on NK cells [10]. Transcription of *CD247* was shown to be downregulated in peripheral blood lymphocytes from patients with long-term surviving kidneys [4, 10]. Toll-like receptor 5 (*TLR5*) is a member of TLR family which plays a fundamental role in the pathogen recognition and associated activation of innate immunity. The expression of *TLR5* was downregulated in operationally tolerant kidney graft recipients [5]. FoxP3 (forkhead box P3) is a key transcription factor in $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatory T cells (Tregs), necessary for their differentiation and maintenance in the periphery [11]. Peripheral blood mRNA levels of *FOXP3* were higher in patients with operational tolerance or stable kidney graft function compared to patients with chronic rejection [7, 8]. A reduced gene-expression ratio of *FOXP3* to α -1,2-mannosidase (*MAN1A1*) was observed for chronically rejecting patients [5, 6]. Alpha-1,2-mannosidases (*MAN1A1*) are transmembrane proteins that specifically cleave α -1,2-linked mannose residues from oligosaccharides and are involved in the synthesis and maturation of N-glycoproteins [12]. *TCAIM* (T cell activation inhibitor, mitochondrial; previously named *TOAG-1*) was highly expressed during the induction and maintenance of tolerance, but was downregulated during acute rejection [6].

The induction therapy (with either lymphocyte-depleting agents including rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) or IL-2 receptor antagonist such as basiliximab) is recommended as part of the initial immunosuppressive regimen in kidney transplant recipients to reduce acute rejection and/or to allow the reduction of other components of the regimen [13].

We and others previously demonstrated that induction therapy with rATG was associated with the expansion of relative numbers of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg during T cell depletion [14, 15] and that basiliximab induction caused the transient appearance and disappearance of $CD4^+CD25^{low/+}FoxP3^+$ and $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg, respectively [14, 16]. Furthermore we showed that high ratios of $CD4^+FoxP3^+$ Tregs to effector T cells in peripheral blood of kidney graft recipients treated with basiliximab induction in early post-transplant period were associated with the absence of rejection [14].

However, little is known about the effect of rATG and basiliximab on the expression of genes associated with rejection or operational tolerance in clinical kidney transplantation. Therefore, in order to address this issue, we measured relative quantities of seven selected molecular markers associated with rejection or tolerance (*CD247*, *GZMB*, *PRF1*, *MAN1A1*, *TLR5*, *FOXP3* and *TCAIM*) and numbers of lymphocyte subpopulations ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, NK, $CD4^+FOXP3^+$) in the peripheral blood of kidney transplant recipients treated with rATG, basiliximab or no-induction.

Methods

Patients and samples

Between September 2009 and November 2010, 75 consecutive recipients of kidney transplants from deceased donors were enrolled in a single-centre prospective study. Written informed consent was obtained from all participants. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (No. 608-08-10). Sixty patients met all of the following inclusion criteria for the study: 1) sufficient mRNA obtained during at least 7/9 sampling time-points, 2) unchanged maintenance immunosuppression, and 3) no steroid-resistant rejection.

Patients were treated in accordance with the centre's immunosuppression treatment protocol which consisted of triple maintenance therapy with a calcineurin inhibitor (CNI; tacrolimus or cyclosporine A), mycophenolate mofetil, and corticosteroids. Patients were recruited for a specific induction therapy on the basis of personal immunologic risk factors. Patients with a panel-reactive antibody (PRA) score $\geq 50\%$ or with previous renal transplantation received 1–1.5 mg/kg/day rATG (Thymoglobulin[®], Genzyme Corporation, Cambridge, MA, $n = 24$) in 2–7 doses during the first week after KTx. Patients with PRA scores of 20–49% or the ones who received a kidney from an extended criteria donor were treated with 20 mg of basiliximab (Simulect[®], Novartis, Basel, Switzerland, $n = 17$) on the day of KTx and 4 days after. Patients with PRA score $< 20\%$ received no induction therapy ($n = 19$).

Peripheral blood samples were collected before and 7, 14, 21, 28, 60, 90 days, 6 months, and 12 months after KTx. Except for differences in the retransplantation frequency, mean PRA score, and donor age, the clinical characteristics did not differ significantly among the three groups (Table 1).

Histology and treatment of rejection

Kidney graft biopsies were performed on the basis of clinical indications (case biopsies) or 90 days after KTx, as defined by the protocol. Acute rejection was diagnosed according to the Banff'05 classification [17]. Borderline changes and grade I or IIA T cell-mediated rejection were

Table 1 Demographic characteristics at the time of transplantation

Variable	No-induction	rATG	Basiliximab	P value
Number	19	24	17	
Gender (M/F)	9/10	16/8	9/8	ns [†]
Recipient age (years)*	57 [27; 70]	54 [21; 78]	53 [25; 65]	ns [‡]
Donor age (years)*	52 [16; 68]	46 [18; 74]	61 [21; 75]	<0.05 ^{†a}
HLA MM*	3 [2; 6]	3 [1; 5]	3 [2; 5]	ns [‡]
1 st /2 nd and 3 rd KTx (n)	19/0	11/13 [§]	16/1	<0.0001 [†]
PRA (%)*	4 [0; 22]	68 [0; 96]	6 [2; 63]	<0.0001 ^{†b}
CNI (TAC/CsA) (n)	21/4	28/0	18/0	ns [†]
CIT (hours)*	16.2 [11.0; 20.7]	15.4 [7.7; 20.1]	17.2 [7.7; 21.0]	ns [‡]
Dialysis time (years)*	2.0 [0.2; 5.7]	1.9 [0.5; 6.4]	2.0 [0.6; 4.9]	ns [‡]
Cause of renal failure				ns [†]
Primary GN	9	9	4	
Hereditary diseases	2	5	4	
Diabetic or ischemic nephropathy	6	2	7	
TIN	2	1	1	
ANCA vasculitis or lupus nephritis	0	4	0	
Other causes	0	3	1	

ANCA Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, CIT cold ischemic time, CNI calcineurin inhibitor, CsA cyclosporine A, GN glomerulonephritis, HLA MM HLA mismatch, PRA historical panel-reactive antibodies, measured every 3 months before transplantation (the highest number in each patient was considered), TAC tacrolimus, TIN tubulointerstitial nephritis, TxR renal transplantation

*Median [min; max]; [†]Chi square test P value; [‡]Kruskal-Wallis test P value

Dunn's Multiple Comparison Test: ^aSignificant difference between the basiliximab group and the rATG group and a ^bsignificant difference between rATG and the no-induction or basiliximab group

[§]2 patients had a 3rd transplantation

treated with 1.5–2 g of methylprednisolone. Antibody-mediated rejection was treated by plasma exchange and intravenous immunoglobulin alternately over the 10-day period.

Flow cytometry and isolation of peripheral blood mononuclear cells

Venous blood samples were collected into sterile EDTA-containing tubes. Lymphocytes from peripheral blood (100 μ L; $\sim 1 \times 10^6$ cells) were labelled with a 4-color monoclonal antibody (mAb) panel: CYTO-STAT tetra-Chrome CD45-FITC (clone: B3821F4A)/CD56-RD1 (clone: N901/NKH1)/CD19-ECD (clone: J3-119)/CD3-PC5 (clone: UCHT1) + CD16-PE (clone: 3G8) and CD45-FITC (clone: B3821F4A)/CD4-RD1 (clone: SFC112T4D11)/CD8-ECD (clone: SFC121Thy2D3)/CD3 (clone: UCHT1) (all Beckman Coulter, Brea, CA).

Extracellular staining of freshly prepared and isolated peripheral blood mononuclear cells was performed with anti-CD4-FITC (clone: RPA-T4) and anti-CD25-APC (clone: BC96) antibodies prior to intracellular staining with anti-FoxP3-PE (clone: PCH101). Tregs were stained for intracellular FoxP3 with the Human Regulatory T Cell Staining Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA). An appropriate isotype control mAb (rat IgG2a-PE, cocktail

of FITC and APC mouse IgG1) was used to establish the settings for FoxP3⁺ Treg analysis.

Stained samples were analysed in the FC 500 flow cytometer with CxP and Kaluza software (Beckman Coulter). Flow cytometric analyses were performed with at least 100 gated events. Lymphocyte subpopulations were defined as follows: T lymphocytes, CD45⁺CD3⁺; cytotoxic T lymphocytes, CD45⁺CD3⁺CD8⁺; and NK cells, CD45⁺CD3⁻CD16⁺CD56^{+/+}. Because basiliximab may downregulate CD25 [16, 18] or interfere with some anti-CD25 mAbs used for flow cytometry [19], Tregs were defined as CD3⁺CD4⁺FoxP3⁺.

Gene expression analysis and RNA isolation

Peripheral blood was drawn directly into PAXgene tubes (Qiagen, Hilden, Germany), frozen, and stored at -20 °C until analysis. Whole-blood RNA was extracted with the PAXgene Blood RNA Kit with DNase I treatment (Qiagen). The purity and concentration of the RNA were assessed in an ultraviolet-visible spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). The RNA isolation method routinely used in our laboratory was validated and standardized on reference samples, to eliminate errors and ensure the same standards across all measurements. The quality of RNA samples obtained by the standard

isolation protocol was assessed with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). An RNA integrity number of 8–10 indicated high-quality RNA suitable for further analysis.

Quantitative RT-PCR analysis

SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used to synthesize cDNA from 2 µg of total RNA isolated from blood samples. Seven genes were selected on the basis of them being previously described as being associated with rejection or tolerance: *GZMB*, *PRF1*, *CD247*, *FOXP3*, *TCAIM* (*C3orf23*), *MAN1A1*, and *TLR5*. Gene expression profiles of these seven genes were determined by quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method), using *HPRT1* and *PGK1* as reference genes. The cDNA from one control blood sample was used for calibration. The mRNA levels were quantified in triplicate for each sample with a predesigned TaqMan® Gene Expression Assay (Hs01554355_m1 for *GZMB* [granzyme B], Hs00169473_m1 for *PRF1* [perforin 1], Hs00167901_m1 for *CD247*, Hs00203958_m1 for *FOXP3*, Hs00603313_m1 for *C3orf23* [TOAG or TCAIM], Hs00195458_m1 for *MAN1A1* [α -1,2-mannosidase], and Hs00152825_m1 for *TLR5*) and the TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR amplification was performed on an ABI Prism® 7900 H.T. Sequence Detection system (Applied Biosystems). Relative quantification analysis was performed in 96-well plates, using the RQ Manager 1.2. software for automated data analysis (Applied Biosystems).

Statistical analyses

Characteristics of the rATG, basiliximab, and no-induction groups were compared by the Kruskal-Wallis test for continuous variables or the χ^2 test for categorical variables. Data were expressed as the median [min; max] or as absolute numbers (*n*). A generalized linear mixed model for repeated measures, adjusted for rejection, donor/recipient age, and incidence of delayed graft function, was used for testing differences in the peripheral blood gene expression and the absolute and relative numbers of lymphocyte subpopulations between groups. Due to the non-normal distribution of data with long right tails, the dependent variable was subjected to gamma regression, with the data expressed as estimated marginal means \pm SEM. Calculations were done with SPSS 20 (IBM Corporation, Somers, NY) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). A two-sided P-value \leq 0.05 was considered statistically significant.

Results

Patient survival, graft function, and rejection

One of the 60 patients died during the follow-up period (day 223 after KTx) due to acute myocardial infarction.

There were no differences among the groups in terms of delayed graft function (no-induction: 4/19, 21 %; rATG: 6/24, 25 %; basiliximab: 7/17, 41 %) or the 12-month serum creatinine, eGFR, and proteinuria results (Table 2). T cell-mediated rejection occurred within 12 months after KTx in 2/19 (10.5 %) of patients without induction and in 3/17 (17.6 %) of patients treated with basiliximab. Antibody-mediated rejection developed in 4/24 (16.7 %) of patients treated with rATG during follow-up. Borderline changes occurred in 7/19 (36.8 %) of patients from no-induction group, 4/24 (16.7 %) of patients from the rATG group, and 7/17 (41.2 %) of patients from the basiliximab group.

T and NK cells

In the rATG group, depletion of T cells ($CD3^+$), the subpopulations ($CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, and $CD4^+$ FoxP3⁺ Tregs), and NK cells were observed at 7 days post-KTx, followed by a slow repopulation (Fig. 1a–d; data for $CD4^+$ not shown). The $CD8^+$ T and NK cell counts reached or exceeded their pre-KTx values at 12 month. The total cell counts for $CD3^+$ T cells, $CD4^+$ T cells, and $CD4^+$ FoxP3⁺ Tregs, however, only reached 66, 34, and 68 % of the preKTx values respectively, at 12 month. The total $CD3^+$ and $CD8^+$ T cells reached substantially higher counts at 12 month as compared to the pre-KTx values in the no-induction and basiliximab groups ($CD3^+$: 147 % and 155 %, $CD8^+$: 170 % and 257 %, respectively).

The absolute numbers of T cells, the subpopulations ($CD4^+$, $CD8^+$, and $CD4^+$ FoxP3⁺ Tregs), and NK cells were lower in the rATG group compared to the no-induction and basiliximab groups during follow-up (all $P < 0.001$; Fig. 1a–d; data for $CD4^+$ not shown). $CD8^+$ T cells were decreased and the Treg cells were increased in the basiliximab group as compared to the no-induction group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$; Fig. 1b, d). In the basiliximab group, the number of Tregs increased soon after KTx, peaking on day 14 and then decreasing towards the pre-KTx level (Fig. 1d).

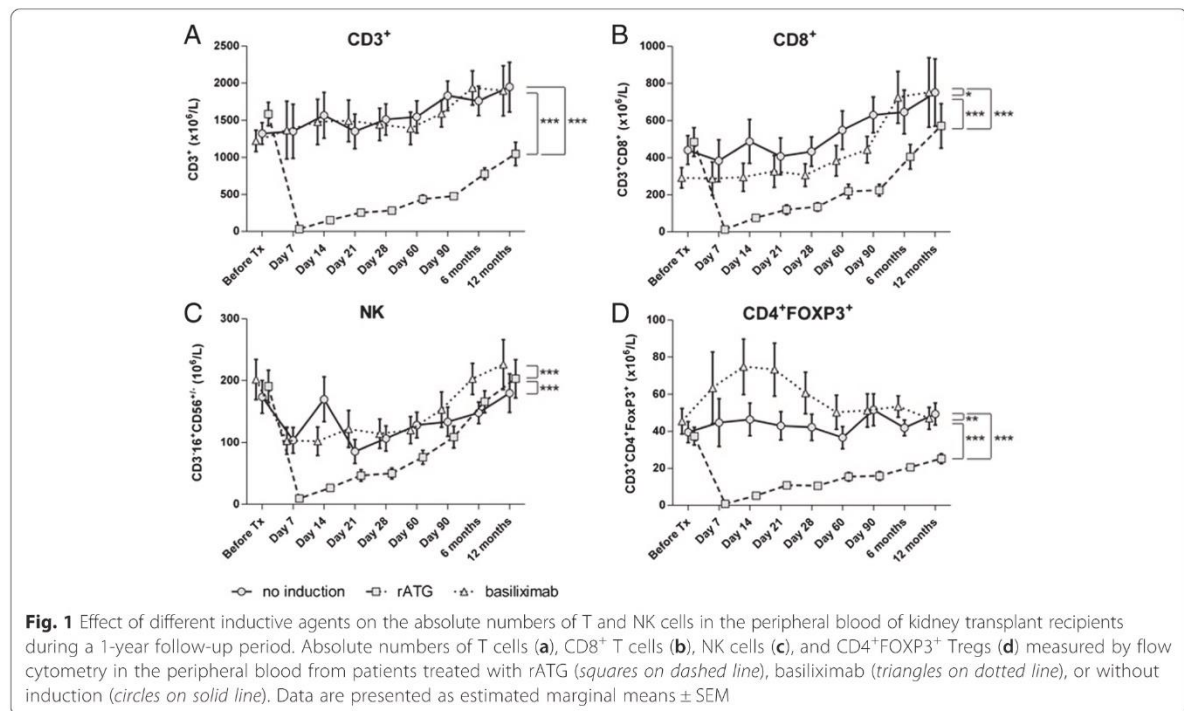
In contrast to the absolute numbers, the frequency of $CD4^+$ FoxP3⁺ Tregs among the $CD4^+$ T cells was increased compared to the pre-KTx levels at day 7 in the rATG and basiliximab group. In rATG group the Treg

Table 2 Graft function at 12 months post transplantation

Variable	No-induction	rATG	Basiliximab	P value
SCr ($\mu\text{mol/L}$)*	120 [73; 260]	121 [51; 261]	137 [82; 246]	ns [‡]
eGFR (mL/s/1.73 m^2)*	0.80 [0.28; 1.18]	0.89 [0.38; 1.81]	0.65 [0.34; 1.45]	ns [‡]
Proteinuria (g/24)*	0.18 [0.07; 2.58]	0.18 [0.07; 11.58]	0.25 [0.08; 1.11]	ns [‡]

eGFR estimated glomerular filtration rate, SCr serum creatinine

*Median [min; max]; [‡]Kruskal-Wallis test P value



frequency peaked at day 21 (to 303 % of the pre-KTx value) and remained high (194 % of the pre-KTx value) at the end of the follow-up period; in basiliximab group CD4⁺FOXP3⁺ Treg frequencies decreased towards the pre-KTx levels after day 7 and remained lower compared to rATG group ($P < 0.001$; data for Treg frequencies not shown). In the no-induction group, the Treg frequencies were stable and lower than those of the rATG and basiliximab group throughout the follow-up period ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively; data for Treg frequencies not shown).

Rejection-associated transcripts

In all groups, transcripts for *CD247*, *GZMB*, and *PRF1* decreased on day 7, thereafter increasing slowly towards their pre-KTx levels. The transcript levels decreased to zero and were lowest among the groups (all $P < 0.001$; Fig. 2a–c) in rATG group. Higher *CD247* and *GZMB* expression levels (both $P < 0.01$) were found in the basiliximab group compared to the no-induction group (Fig. 2a, b).

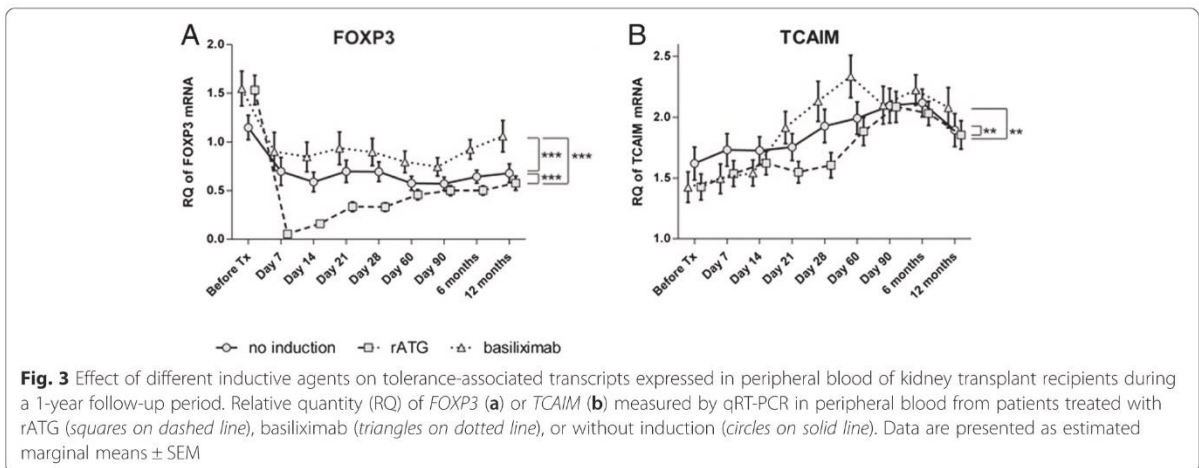
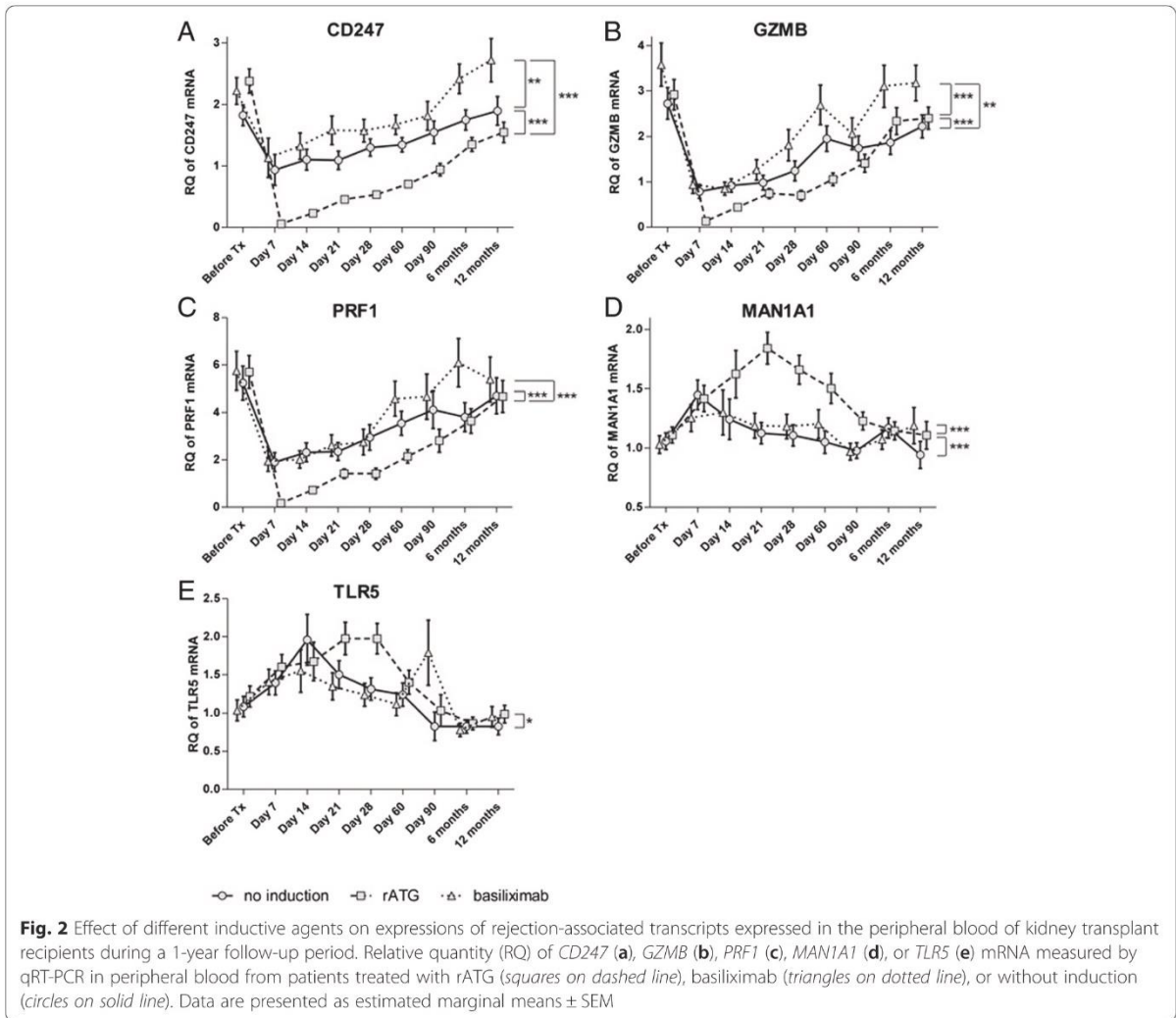
MANIA1 expression was highest ($P < 0.001$) in the rATG group as compared to basiliximab and no-induction groups (Fig. 2d). In all groups, the *MANIA1* expression was increased on day 7 compared to the pre-KTx level. *MANIA1* expression continued to increase in the rATG group, whereas it stabilized in the other two groups on day 14. In the rATG group, the *MANIA1* expression

peaked at day 21 and, thereafter, decreased towards its pre-KTx value. Substantial differences in *MANIA1* expression were observed between the rATG group and other groups from days 21 to 90 (Fig. 2d). The *TLR5* mRNA expression was higher in the rATG group than in the no-induction group ($P < 0.05$; Fig. 2e).

Tolerance-associated transcripts

Similar to the findings for *CD247*, *GZMB*, and *PRF1*, the mRNA expression of *FOXP3* was decreased in all groups on day 7 compared to the pre-KTx level with the most profound decrease and subsequent increase towards the pre-KTx level in the rATG group. *FOXP3* expression was lowest in the rATG group; it was higher in the basiliximab group than in the no-induction group (all $P < 0.001$; Fig. 3a).

The trend of the mRNA expression ratio of *FOXP3* to *MANIA1* was similar to that of the *FOXP3* expression; the ratio decreased on day 7 in all groups, with the most profound decrease and subsequent increase towards pre-KTx levels being seen in the rATG group. The lowest ratio was found in the rATG group (all $P < 0.001$; data not shown). The *TCAIM* mRNA expression constantly increased in all groups, with basiliximab- and rATG-treated patients displaying the fastest and slowest increases, respectively, among the groups ($P < 0.01$; Fig. 3b).



Discussion

To the best of our knowledge, this is the first prospective trial that aimed to evaluate the effects of different induction agents on molecular markers associated with rejection or operational tolerance in kidney transplant recipients. We analysed the relative quantity of seven selected T cell-related transcripts, associated with operational tolerance or rejection, and lymphocyte subpopulations in KTx patients treated with different induction regimens. In our study the rATG induction therapy was associated with profound decrease of T and NK cells, as well as T cell transcripts that are exclusively expressed by these cell types. In rATG group the transient upregulation of *MANIA1* and *TLR5* transcripts, previously shown to be associated with chronic rejection [5], was observed. Basiliximab induction resulted in a transient increase in $CD4^+FoxP3^+$ Tregs, accompanied by the highest peripheral expression levels of markers associated with operational tolerance (*FOXP3* and *TCAIM*).

Many studies have documented the dose-dependent depletion effect of rATG on T and NK cells [20–24]. However, little is known about transcript-level changes due to rATG treatment. Simon *et al.* described the effect of ATG induction therapy on expression of 10 immunologically relevant genes in the early post-transplant period and found decrease of *GZMB* and *PRF1* expression [25]. We observed a profound drop in the relative mRNA quantities of *CD247*, *GZMB*, *PRF1*, and *FOXP3* early after transplantation in rATG group. These transcripts are expressed exclusively by T and NK cells and are present at different levels in rejecting or operationally tolerant patients [2, 3, 7, 8]. The profound drop was followed by a slow increase towards pre-KTx levels in rATG patients, corresponding to the depletion and progressive repopulation of the aforementioned cell types.

Interestingly, in the early period after KTx, there was a decrease in gene expression of *CD247*, *GZMB*, *PRF1*, and *FOXP3*, followed by a return to pre-KTx levels, in patients who were treated with basiliximab or without induction. This finding can likely be explained by the decreased NK cell counts and the effect of maintenance therapy on gene expression. The calcineurin-dependent mechanism of action involves the binding of CNIs to their respective immunophilins. CNIs inhibit the transcription of proinflammatory and T cell-recruiting cytokines, such as interleukin (IL)-2 [26]. IL-2 regulates the gene expression of perforin and granzyme [27]. It directly promotes the transcription of FoxP3 [28, 29]. Moreover, IL-2 has been shown to augment TCR- ζ (*CD247*) expression in chronic inflammation [30].

While the expressions of *CD247*, *GZMB*, *PRF1*, and *FOXP3* were downregulated, *MANIA1*, *TLR5* and *TCAIM* transcripts were upregulated early after KTx in all groups. These transcripts might be expressed preferentially by

other cell types than T cells which are more susceptible to induction and maintenance immunosuppression. *TCAIM*, *MANIA1* and *TLR5* are expressed not only by T cells, but also by macrophages/monocytes and dendritic cells [6, 31–35]. The Indices of Tolerance Research Network ranked *TLR5* as one of the top-10 gene markers for distinguishing between drug-free operationally tolerant and chronically rejecting kidney recipients. Specifically, *TLR5* was highly expressed in patients with chronic rejection, whereas it was downregulated in tolerant patients [5]. Similarly, increased expression of the other member of toll-like receptors *TLR4* was observed in kidney transplant recipients with chronic rejection compared to operationally tolerant patients [36]. After haematopoietic stem cell transplantation, patients experiencing graft-versus-host disease had increased peripheral *TLR5* expression; adoptive Treg therapy reduced this expression by preventing the disease [34]. Although the differences in *TLR5* expression in our study were statistically significant, the clinical significance remains questionable.

TCAIM has been shown to be highly expressed during the induction and maintenance of operational tolerance to donor alloantigens *in vivo*, resulting in the acceptance of kidney and heart allografts in rats and mice [6]. *TCAIM* expression was downregulated in the peripheral blood and the graft before rejection. This downregulation has been shown to occur in graft-infiltrating cells and after T-cell activation *in vitro* [6, 37]. The *TCAIM* protein is localized exclusively within mitochondria. *TCAIM*-expressing murine T cells have been shown to be more susceptible to apoptosis [38]. An increased *TCAIM* mRNA level was described after administration of regulatory macrophages to patients before living-donor KTx [39]. In a rat KTx model, intragraft expression of *TCAIM* was dramatically reduced in untreated rejecting recipients and in recipients who received an adoptive transfer of memory T cells [40]. Recently, it was shown that *TCAIM* inhibited spontaneous development of memory and effector T cells [41]. Higher *FOXP3* and *TCAIM* expressions along with Treg numbers in basiliximab group may suggest a protective potential of basiliximab. Here we showed that basiliximab induction was associated with a transient increase in absolute numbers of $CD4^+FoxP3^+$ Tregs which was in line with findings of Bluestone *et al.* [42]. However the debate has not been finished yet and there are also other observations [43, 44]. The rATG induction resulted in long-lasting and profound depletion of absolute numbers of $CD4^+FoxP3^+$ Tregs that corresponded to decreased level of *FOXP3* gene expression.

Conclusions

Induction immunosuppression with rATG was associated with long-lasting suppression of T and NK cell-associated

genes, and with the upregulation of markers associated with rejection, *MAN1A1* and *TLR5*, within the first month after KTx. In contrast, basiliximab induction resulted in a fast increase in CD4⁺FoxP3⁺ Tregs and expression of some markers associated with operational tolerance.

Abbreviations

KTx: Kidney transplantation; rATG: rabbit anti-thymocyte globulin; NK: Natural killer cells; Treg: Regulatory T cell; GZMB: Granzyme B; PRF1: Perforin; CD247: ζ -chain of T cell receptor; FoxP3: Forkhead box P3; TLR5: Toll-like receptor 5; MAN1A1: α -1,2-mannosidase; TCAIM: T cell activation inhibitor, mitochondrial; CNi: Calcineurin inhibitor.

Competing interests

O.V. received lecture fees from Sanofi and Novartis.

Authors' contributions

OV, EK, IB and BS participated in designing the research. EK, OV, PH and BS participated in writing the paper. EK, OV, IB, AS and IS participated in performing the research. PW, EK, IB, PH and OV participated in analyzing the data. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA MZCR NT14102-3/2013, NS10517-3/2009, and NT11227-5/2010), the Grant Agency of the Czech Republic (P301/11/1568), the European Regional Development Fund (ED2.1.00/03.0076), and the 7FP program of EU BioDrim and MABSOT. The authors are indebted to Romana Polackova, Martina Ondrakova, Katarina Barcikova, Eva Faberova, and Adela Sajdlova for their technical assistance and coordination of sample collection, as well as to the patients and nurses for their cooperation and help.

Author details

¹Transplant Laboratory, Centre for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic. ²Department of Clinical and Transplant Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic. ³Department of Preventive Cardiology, Cardiology Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic. ⁴Institute of Medical Immunology and Berlin-Brandenburg Centre for Regenerative Therapies (BCRT), Charité University Medicine, Berlin, Germany. ⁵Department of Nephrology, Transplant Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958, 14021 Prague, Czech Republic. ⁶Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic.

Received: 17 June 2015 Accepted: 6 August 2015

Published online: 19 August 2015

References

- Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC, Holdaas H. Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet*. 2011;378:1419–27.
- Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med*. 2001;344:947–54.
- Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Susal C. Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant*. 2003;3:1121–7.
- Alvarez CM, Paris SC, Arango L, Arbelaz M, Garcia LF. Kidney transplant patients with long-term graft survival have altered expression of molecules associated with T-cell activation. *Transplantation*. 2004;78:1541–7.
- Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120:1848–61.
- Sawitzki B, Bushell A, Steger U, Jones N, Risch K, Siepert A, et al. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant*. 2007;7:1091–102.
- Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4 + T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 2006;81:398–407.
- Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, Miwa Y, Kuzuya T, Iwasaki K, et al. Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. *Transplantation*. 2011;91:191–8.
- Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*. 2012;93:1–10.
- Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:675–87.
- Bluestone JA. Mechanisms of tolerance. *Immunol Rev*. 2011;241:5–19.
- Herscovics A. Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. *Biochimie*. 2001;83:757–62.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9 Suppl 3:S1–155.
- Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, Brabcova I, Girmanova E, Viklicky O. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27:2576–82.
- Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, Allam SR, Montague T, Bromberg JS, et al. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant*. 2010;10:2132–41.
- Vondran FW, Timrott K, Tross J, Kollrich S, Schwarz A, Lehner F, et al. Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation. *Transpl Int*. 2010;23:514–23.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant*. 2007;7:518–26.
- Wang Z, Shi BY, Qian YY, Cai M, Wang Q. Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol*. 2009;155:496–503.
- Abadja F, Alamartine E, Berthoux F, Mariat C, Genin C, Lambert C. Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation*. 2010;89:366–8.
- Kho MM, Bouvy AP, Cadogan M, Kraaijeveld R, Baan CC, Weimar W. The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2012;26:186–90.
- Sageshima J, Ciancio G, Guerra G, Gaynor JJ, Cova D, Zarak A, et al. Prolonged lymphocyte depletion by single-dose rabbit anti-thymocyte globulin and alemtuzumab in kidney transplantation. *Transpl Immunol*. 2011;25:104–11.
- Vacher-Coponat H, Brunet C, Moal V, Loundou A, Bonnet E, Lyonnet L, et al. Tacrolimus/mycophenolate mofetil improved natural killer lymphocyte reconstitution one year after kidney transplant by reference to cyclosporine/azathioprine. *Transplantation*. 2006;82:558–66.
- Hadaya K, Avila Y, Valloton L, de Rham C, Bandelier C, Ferrari-Lacraz S, et al. Natural killer cell receptor-repertoire and functions after induction therapy by polyclonal rabbit anti-thymocyte globulin in unsensitized kidney transplant recipients. *Clin Immunol*. 2010;137:250–60.
- Sewgobind VD, Kho MM, van der Laan LJ, Hendriks TK, van Dam T, Tilanus HW, et al. The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:1635–44.
- Simon T, Opelz G, Weimer R, Wiesel M, Feustel A, Ott RC, et al. The effect of ATG on cytokine and cytotoxic T-lymphocyte gene expression in renal allograft recipients during the early post-transplant period. *Clin Transplant*. 2003;17:217–24.
- Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc*. 2004;36:255–325.
- Janas ML, Groves P, Kienle N, Kelso A. IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol*. 2005;175:8003–10.
- Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3 + regulatory T cells. *J Immunol*. 2007;178:280–90.

29. Murawski MR, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, Davoodi-Semiromi A. Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1079:198–204.
30. Cheriyan VT, Thomas C, Balam P. Augmentation of T-cell immune responses and signal transduction proteins in oral cancer patients: potential for IL-2-mediated immunotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137:1435–44.
31. Vogel SZ, Schlickeiser S, Jurchott K, Akyuez L, Schumann J, Appelt C, et al. TCAIM decreases T cell priming capacity of dendritic cells by inhibiting TLR-induced Ca²⁺ influx and IL-2 production. *J Immunol.* 2015;194:3136–46.
32. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5:987–95.
33. Jenner J, Kerst G, Handgretinger R, Müller I. Increased alpha2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells. *Exp Hematol.* 2006;34:1212–8.
34. Sawitzki B, Brunstein C, Meisel C, Schumann J, Vogt K, Appelt C, et al. Prevention of graft-versus-host disease by adoptive T regulatory therapy is associated with active repression of peripheral blood Toll-like receptor 5 mRNA expression. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:173–82.
35. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, et al. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 2008;9:769–76.
36. Braudeau C, Ashton-Chess J, Giral M, Dugast E, Louis S, Pallier A, et al. Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2008;86:130–6.
37. Gebuhr I, Keeren K, Vogt K, Höflich C, Appelt C, Schlieer U, et al. Differential expression and function of alpha-mannosidase I in stimulated naive and memory CD4⁺ T cells. *J Immunother.* 2011;34:428–37.
38. Keeren K, Friedrich M, Gebuhr I, Philipp S, Sabat R, Sterry W, et al. Expression of tolerance associated gene-1, a mitochondrial protein inhibiting T cell activation, can be used to predict response to immune modulating therapies. *J Immunol.* 2009;183:4077–87.
39. Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, Tomiuk S, Miqueu P, Zuhayra M, et al. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol.* 2011;187:2072–8.
40. Siepert A, Ahrlich S, Vogt K, Appelt C, Stanko K, Kühl A, et al. Permanent CNI treatment for prevention of renal allograft rejection in sensitized hosts can be replaced by regulatory T cells. *Am J Transplant.* 2012;12:2384–94.
41. Schumann J, Stanko K, Woertge S, Appelt C, Schumann M, Kühl AA, et al. The Mitochondrial Protein TCAIM Regulates Activation of T Cells and Thereby Promotes Tolerance Induction of Allogeneic Transplants. *Am J Transplant.* 2014;14:2723–35.
42. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, Laszik ZG, Putnam A, Belingheri M, et al. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8:2086–96.
43. de Goer de Herve MG, Gonzales E, Hendel-Chavez H, Décline JL, Mourier O, Abbed K, et al. CD25 appears non essential for human peripheral T(reg) maintenance in vivo. *PLoS One.* 2010;5, e11784.
44. Bouvy AP, Klepper M, Kho MM, Boer K, Betjes MG, Weimar W, et al. The impact of induction therapy on the homeostasis and function of regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29:1587–97.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5.3. Subpopulace monocytů po transplantaci ledviny

Úvod

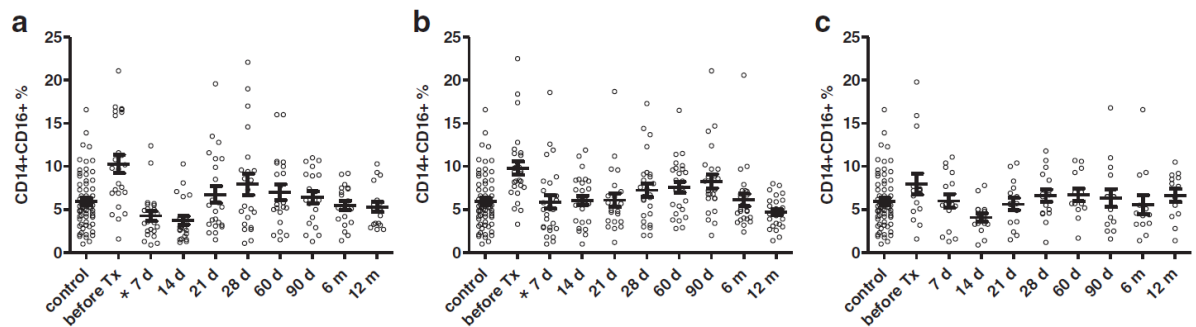
Monocyty představují heterogenní populaci buněk dále rozdělenou podle stupně exprese membránových antigenů/znaků. Prozánětlivá (intermediální/neklasická) subpopulace monocytů je definována expresí znaku CD16. Zatímco znak CD163 se zdá být charakteristicky preferenčně exprimován imunosupresivními monocyty. Cílem naší studie bylo monitorovat změny v periferních subpopulacích monocytů v časně fázi po transplantaci ledviny s ohledem na různé použité imunosupresivní režimy.

Metody

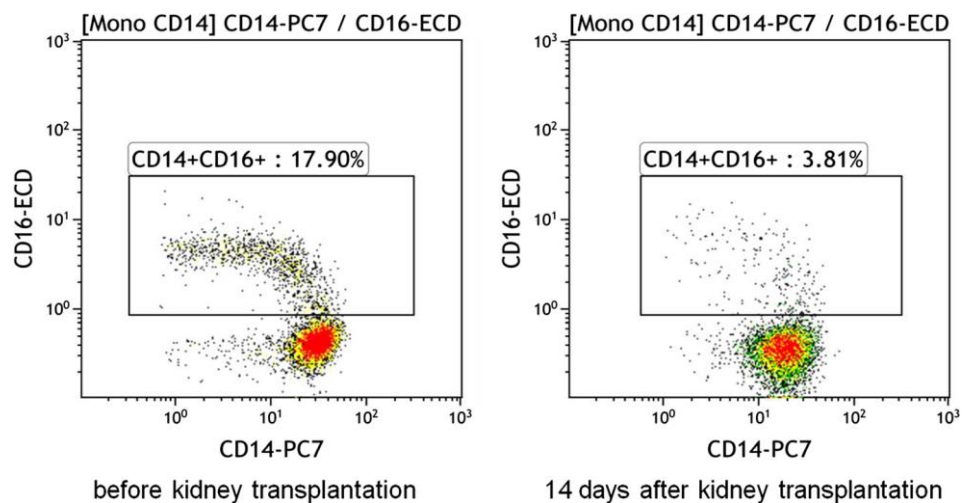
V periferní krvi 71 prospektivně sledovaných příjemců ledvinného štěpu a 20 zdravých dobrovolníků byly monitorovány subpopulace monocytů pomocí průtokové cytometrie. Pacientům byly odebírány vzorky krve před transplantací a 7., 14., 21., 28., 60. a 90. den a 6 a 12 měsíců po transplantaci. Pacienti byli léčeni trojkombinací imunosupresivní terapie s CNI a indukcí rATG (n=28), basiliximabem (n=18) nebo bez indukce (n=25). Pro *in vitro* experiment byly použity izolované PBMC, které byly stimulovány různými koncentracemi rATG, basiliximabu nebo methyprednisolonu. Zastoupení CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů bylo hodnoceno průtokovou cytometrií před stimulací a v časových odstupu po stimulaci (0, 3, 6, 24, 48 a 72 hod).

Výsledky

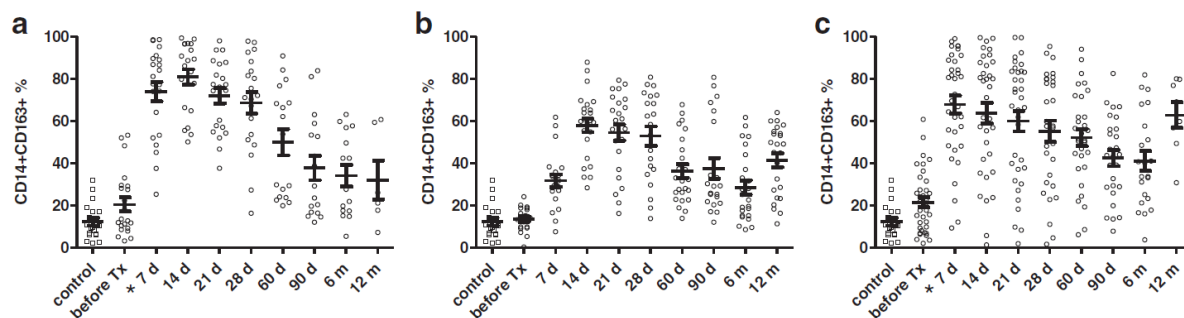
Fenotypy monocytů zastoupené v periferní krvi byly analyzovány průtokovou cytometrií v definovaných časech. Relativní počty periferních CD14⁺CD16⁺ monocytů se snížily okamžitě po transplantaci a indukční léčba basiliximabem částečně oslabila tento trend. Přejídná down-regulace CD14⁺CD16⁺ subpopulace se přiblížila k bazálním hodnotám dva měsíce po transplantaci. Relativní počty CD14⁺CD163⁺ monocytů byly přechodně zvýšeny krátce po transplantaci a zůstaly vyšší během prvního měsíce po transplantaci u většiny pacientů. U pacientů léčených rATG indukcí byla expanze CD14⁺CD163⁺ opožďena, ale trvala déle. *In vitro* experimenty ukázaly přímý efekt rATG a methylprednisolonu na expresi molekul CD16 a CD163, zatímco basiliximab fenotyp kultivovaných monocytů neovlivnil.



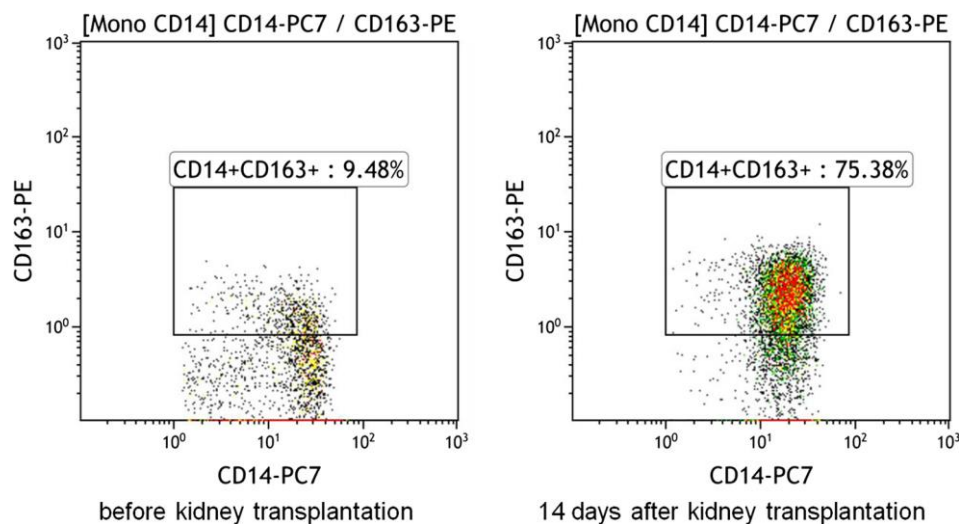
Obrázek 5.6 Relativní počty $CD14^+CD16^+$ monocytů v periferní krvi pacientů po transplantaci ledvin. Monocyty současně exprimující na svém povrchu molekuly $CD14$ a $CD16$ byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie u pacientů po transplantaci ledviny léčených bez indukce (A), s indukcí $rATG$ (B) nebo basiliximabem (C). Jako kontroly posloužily vzorky krve zdravých dobrovolníků. *Statisticky signifikantní rozdíly.



Obrázek 5.7 Snížení $CD14^+CD16^+$ subpopulace monocytů po transplantaci ledviny. Reprezentativní bodový graf u pacienta léčeného bez použití indukce.



Obrázek 5.8 Relativní počty $CD14^+CD163^+$ monocytů v periferní krvi pacientů po transplantaci ledvin. Monocyty současně exprimující na svém povrchu molekuly $CD14$ a $CD163$ byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie u pacientů po transplantaci ledviny léčených bez indukce (A), s indukcí rATG (B) nebo basiliximabem (C). Jako kontroly posloužily vzorky krve zdravých dobrovolníků. *Statisticky signifikantní rozdíly.



Obrázek 5.9 Zvýšení $CD14^+CD163^+$ subpopulace monocytů po transplantaci ledviny. Reprezentativní bodový graf u pacienta léčeného bez použití indukce.

Závěr a shrnutí studie

Z našich výsledků usuzujeme, že transplantace ledviny je spojena se změnou monocytárních subpopulací CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ a je částečně ovlivněna použitým imunosupresivním režimem. Počet periferních CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů by se mohl stát jedním z potenciálně perspektivních ukazatelů ke zhodnocení imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny. Indukce imunosupresivních CD14⁺CD163⁺ monocytů a potlačení prozánětlivých intermediálních/neklasických CD14⁺CD16⁺ monocytů by mohla hrát protektivní úlohu v časně fázi po transplantaci ledviny.

Práce byla publikována v časopise BMC Immunology:

Sekerkova A, Krepsova E, Brabcova E, Slatinska J, Viklicky O, Lanska V, Striz I. **CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺CD163⁺ monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation.** BMC Immunol. 2014 Feb 6;15:4. IF 2.481

RESEARCH ARTICLE

Open Access

CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation

Alena Sekerková^{1*}, Eva Krepsová², Eva Brabcová¹, Janka Slatinská³, Ondrej Viklický^{2,3}, Vera Lanská⁴ and Ilja Striz¹

Abstract

Background: Monocytes represent a heterogeneous population of cells subdivided according to the expression level of membrane antigens. A pro-inflammatory (intermediate/nonclassical) subpopulation of monocytes is defined by expression of CD16. CD163 seems to be characteristically preferentially expressed by immunosuppressive monocytes. The aim of our study was to evaluate the distribution of monocyte subpopulations in 71 patients with kidney allograft transplantation.

Results: The phenotype was evaluated by flow cytometry in defined time points. The proportions of peripheral CD14+CD16+ monocytes were downregulated immediately after the kidney transplantation and basiliximab treatment partially attenuated this trend. The transient downregulation of the CD14+CD16+ subpopulation was adjusted to basal values in two months. The proportions of CD14+CD163+ monocytes were transiently upregulated early after the kidney transplantation and remained higher during the first month in most patients. In ATG treated patients, the expansion of CD14+CD163+ monocytes was delayed but their upregulation lasted longer. In vitro data showed the direct effect of ATG and methylprednisolone on expression of CD16 and CD163 molecules while basiliximab did not affect the phenotype of cultured monocytes.

Conclusions: We assume from our data that kidney allograft transplantation is associated with modulation of monocyte subpopulations (CD14+CD16+ and CD14+CD163+) partially affected by an immunosuppressive regime used.

Keywords: CD14+CD16+, CD14+CD163+, Kidney, Monocytes, Subpopulations, Transplantation

Background

In kidney transplantation, monocytic infiltration of the graft plays a key role in renal dysfunction [1] and their cytokines are actively involved in the process of acute rejection [2]. Peripheral blood monocytes represent highly efficient effector cells of innate immunity subdivided into different subpopulations by the expression level of membrane antigens CD14 (a receptor for bacterial LPS) and CD16 (Fc gamma RIII). These classical monocytes are characterized by a very high expression of CD14 and the absence of CD16 on their surface. Nevertheless, a subpopulation of monocytes does exist with lower CD14 expression and detectable CD16 molecule on a membrane [3]. These CD14+CD16+ intermediate/nonclassical monocytes represent up to 15% of peripheral blood

monocytes but their numbers may be increased in patients with bacterial sepsis, TB or HIV infections [4]. These monocytes are smaller [5] and can be distinguished from CD14+CD16- monocytes by high HLA-DR and CD43 expression [6]. The subpopulations of monocytes also differ in the expression of chemokine receptors [7] and some of the functional activities. CD14+CD16+ monocytes are high producers of proinflammatory cytokine TNF alpha with limited capability to release anti-inflammatory IL-10 [8]. High expression of HLA-DR antigens might be one of the factors responsible for better antigen-presenting capacity of CD14+CD16+ monocytes [9]. In consideration of these properties, CD14+CD16+ cells should be considered as characteristic intermediate/nonclassical proinflammatory monocytes. The proportion of this monocytic subpopulation in the peripheral blood may be increased also in non-infectious inflammatory disorders such as Crohn's disease [10], rheumatoid arthritis [11], bronchial asthma or sarcoidosis [12]. Furthermore,

* Correspondence: alena.sekerkova@ikem.cz

¹Department of Clinical and Transplant Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, Prague 4 140 21, Czech Republic
Full list of author information is available at the end of the article

CD14+CD16+ monocytes are extensively studied with respect to the pathophysiology of atherosclerosis [13,14] including kidney transplant patients [15]. In contrast to these intermediate/nonclassical CD14+CD16+ monocytes, CD163 expression seems to be a marker of monocyte subset downregulating immune responses. This scavenger molecule for hemoglobin-haptoglobin complexes [16] functions also as a receptor for cytokine TWEAK [17] and some bacteria [18] and its expression is upregulated in response to glucocorticoids [19]. CD163 positive monocytes and macrophages (designed as M2 subset) are known to produce cytokine IL-10 suppressing effector immune mechanisms [20]. Among other myeloid antigens, the CD36 known to be upregulated during monocyte extravasation [21], and CD74, a receptor for macrophage migration inhibitory factor [22], represent additional markers of potential interest. In this respect, the aim of our prospective observational study was to monitor changes of peripheral monocyte subpopulations in early phases of kidney allograft transplantation with regard to different modes of induction immunosuppressive therapy.

Methods

Patients

In total, 20 healthy control and 71 patients who underwent renal transplantation from a deceased donor were enrolled in the study. Healthy controls were volunteers (age between 25–50 years) with no clinical symptoms, with no significant clinical diagnosis. None of the enrolled volunteers had transplantation in the past.

All patients were treated by a triple maintenance therapy consisting of calcineurin inhibitor (CNI, either tacrolimus or cyclosporine A), mycophenolate mofetil (MMF) and corticosteroids, with or without induction therapy. MMF and steroid therapy was started at day 0, CNI was given at day 0 or 1 of transplantation. Patients with panel reactive antibodies (PRA) >50% received 1–1.5 g/kg/day of rATG (Thymoglobulin[®], Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA; n = 28) in 2 to 7 doses during the first postoperative week with respect to depletive effect. Patients with PRA 20–50% or those who received a kidney from extended criteria donor were treated by 20 mg of basiliximab (Simulect[®], Novartis, Basel, Switzerland n = 18) on days 0 and 4. Low risk patients (PRA <20%) received no induction therapy (control group, n = 25).

Except for a difference in the frequency of retransplantation, mean percentage of panel reactive antibodies (PRA), and donor age, the clinical characteristics did not differ significantly between the three groups (Table 1). Peripheral blood samples were collected at following time-points: before transplantation and 7, 14, 21, 28, 60, 90 days and 6, 12 months post-transplantation. Serum creatinine (SCr), incidence of delayed graft function

(DGF), estimated glomerular filtration rate (eGFR, calculated using MDRD₁ formula), proteinuria and incidence of rejection during 3 months after transplantation and at 3-month protocol biopsy were recorded in patients. All patients gave their informed consent and signed their agreement with each biopsy performed. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (No.:608-08-10).

All patients underwent renal graft biopsy upon clinical presumption of acute rejection such as insufficient decline or sudden rise of serum creatinine. Furthermore, patients underwent the protocol biopsy at three months after transplantation. Biopsy-proven acute rejection was diagnosed histologically according to the Banff '05 classification [23]. Borderline changes and T cell-mediated rejection (TCMR) grade I and IIA were treated by 1.5–2 g of methylprednisolone, TCMR grades IIB, III and steroid-resistant TCMR by rATG (10 dose; 2 mg/kg 1st day and 1 mg/kg 2nd–10th day of treatment) and antibody-mediated rejection (AMR) by plasma exchange and intravenous immunoglobulin alternately during 10 days.

Three patients with no induction who obtained rATG as a treatment of severe acute rejection (first dose: day 12, 8 and 8) were excluded from group comparison statistics of flow cytometry data.

Flow cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (100 ul, approx. 1×10^6) were labeled with fluorochrome-conjugated (PE – phycoerythrin, PC7 – phycoerythrin-cyanine 7, PC5 – phycoerythrin-cyanine 5, FITC – fluorescein) monoclonal antibodies resuspended in PBS-BSA buffer for 20' at room temperature (RT) in the dark. The following antibodies were used: CD36-FITC, CD14-PC7, CD16-ECD (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), CD74-Alexa Fluor 647, CD163 (clone GHI61)-PE, CD163 (clone RM3/1)-PE (BioLegend). Fresh blood (100 ul) with monoclonal antibodies were incubated 20' in the room temperature in the dark. Samples were lysed with 0.5 ml lysing solution OptilyseC (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) 10' the room temperature in the dark. Lysing reaction was stopped with 1 ml CellWash (optimized PBS) (Beckton Dickinson Bioscience, Benelux, Belgium). Samples were measured on a FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and analyzed using CxP software and Kaluza software (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Gating strategy: monocytes were gated by side scatter and CD14 expression. Subsequently CD 16, CD36, CD74 and CD163 were measured on the cell surfaces. A flow cytometry analysis was performed with at least 100 events in the gate. The absolute number of monocyte subpopulations are calculated from the absolute number of leukocytes and are shown as number of cells * 10^6 /l. Absolute number of

Table 1 Demographic characteristics at the time of transplantation

	No induction	rATG	Basiliximab	P-value
Number	25	28	18	
Gender (male/female)	14/11	19/9	9/9	n.s. ^b
Recipient age (years)	57.9 [27.7; 73.3]	52.9 [21.5; 78.6]	52.9 [25.6; 67.1]	n.s. ^d
Donor age (years)	52.0 [16.0; 68.0]	46.5 [22.0; 74.0]	63.5 [46.0; 75.0]	<0.001 ^{d,e}
^a HLA MM	3 [1; 6]		[2; 5]	n.s. ^d
1st/2nd and 3rd T x R (n)	25/0	12/16	18/0	<0.0001 ^b
^a PRA (%)	4 [0; 36]	64 [0; 96]	7 [0; 44]	<0.0001 ^{d,g}
^a CNI (TAC/CsA)(n)	21/4	28/0	18/0	n.s. ^b
^a CIT (hours)	15.2 [11.0; 20.7]	15.9 [7.7; 22.8]	17.6 [12.4; 21.0]	n.s. ^d
Dialysis time (years)	2.0 [0.2; 9.42]	2.2 [0.5; 6.37]	2.1 [0; 4.9]	n.s. ^d
Cause of renal failure				n.s.
Primary GN	10	10	5	
Hereditary diseases	4	6	6	
Diabetic or ischaemic nephropathy	8	2	5	
^a TIN	2	3	1	
^a ANCA vasculitis or lupus nephritis	0	4	0	
Other causes	1	3	1	

^aANCA, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies; CIT, cold ischaemic time; CNI, calcineurin inhibitor; CsA, cyclosporine A; GN, glomerulonephritis; HLA MM, HLA mismatch; PRA, historical panel reactive antibodies, measured every 3 months before transplantation, the highest number was considered in each patient; TAC, tacrolimus; TIN, tubulointerstitial nephritis; T 3, renal transplantation.

^bChi square test P-value.

^cKruskal–Wallis test P value.

^dDunn's multiple comparison test: significant difference between the basiliximab group and the rATG or controls.

^eDunn's multiple comparison test: significant difference between rATG and the no induction or basiliximab groups.

leukocytes was measured by hematology analyzer Sysmex (Sysmex Corporation, Japan).

"In vitro" cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Three healthy volunteers (between 30–55 years) with no clinical symptoms, with no significant clinical diagnosis and without transplantation in the past were selected for in vitro experiments. Fresh blood (50 ml) was collected from each individual into a tube containing EDTA.

PBMCs were purified using standard Ficoll-Paque gradient centrifugation. Briefly, 3 ml of Ficoll-Paque gradient was pipetted into a 15-ml centrifuge tube. The EDTA blood was diluted 1:1 in phosphate-buffered saline (PBS) and carefully layered over the Ficoll-Paque gradient (3 ml/tube). The tubes were centrifuged for 30 min at 580 × g. The cell interface layer was harvested carefully and the cells were washed once in PBS (for 10 min at 180 × g) and then once in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS), L-glutamin, penicillin and streptomycin (Sigma-Aldrich), (for 10 min at 180 × g). Cells were harvested from the surface by using Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Isolated cells were cultured in duplicates in 24-well tissue culture plates (Costar, Corning, NY, USA) under a 5%

CO₂ atmosphere at 37° in RPMI-1640 supplemented with ATG (1, 10 and 100 ug/ml), basiliximab (1, 10, 100 and 1000 ng/ml) or methylprednisolon (10, 100, 1000 ug/ml). Non-stimulated cells were used as a negative control. The proportions of CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocytes were evaluated in duplicates by flow cytometry at times 0;1;3;6;24;48 and 72 hours after stimulation. Cell viability was evaluated using a Vi-Cell analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). In ATG-stimulated cells, 72 h culture affected the viability of monocytes and data were not analyzed at this time point.

Statistics

Statistical analyses were performed by GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and BMDP PC-90 statistical software (BMDP Statistical Software Inc., Los Angeles, CA, USA). Based on the distribution of the data (Shapiro-Wilk's test for normality), we performed parametric or nonparametric (Mann–Whitney, Kruskal–Wallis) testing. For analysis of categorical variables, the chi-square test was used. Data are showed as median [min; max] according to the distribution. Analysis of data from flow cytometry was performed by ANOVA with repeated measures, comparison within groups between two time points by contrasts. Dynamics

of the parameters was fitted by quadratic regression and the estimated coefficients were compared by z-statistics.

Results

Patient and graft survival

From a total of 71 patients, three patients underwent graft nephrectomy (Day 4, 20 and 58 after transplantation) for renal vein thrombosis, acute hemorrhage after biopsy or primary non-functional graft, respectively; 2 patients died on Days 56 and 80 of sudden death and pulmonary artery embolism, respectively. Two patients withdrew their informed consent to participate in the study at Days 14 and 60.

Graft function

The three patient groups examined did not differ in the incidence rates of DGF: controls: 8/25 (32%); the rATG group: 7/28 (25%) and the basiliximab group: 9/18 (50%). No significant differences in the levels of SCr, eGFR and proteinuria were observed, respectively, between treatment groups 90 days post-transplantation: controls, 127 [61; 314] $\mu\text{mol/L}$, 0.76 [0.19; 1.46] mL/s/1.73 m^2 and 0.22 [0.07; 2.18] g/24 h ; rATG, 120 [57; 239] $\mu\text{mol/L}$, 0.78 [0.29; 1.57] mL/s/1.73 m^2 and 0.18 [0.10; 2.15] g/24 h and basiliximab, 153 [79; 278] $\mu\text{mol/L}$, 0.59 [0.28; 1.10] mL/s/1.73 m^2 and 0.28 [0.07; 0.49] g/24 h .

Graft rejection

Acute rejection occurred during the first 3 months in 4/24 (16.7%) control group patients, 3/28 (10.7%) rATG patients and in 2/18 (11.1%) basiliximab-treated patients ($P > 0.05$). There were another five patients with borderline changes in the control group and seven were treated with basiliximab. In patients without induction therapy, two patients suffered from early acute TCMR, one patient from acute AMR and one patient had a combined type of rejection. In patients with rATG induction, three patients suffered from AMR and in those with basiliximab, one patient suffered from early acute TCMR and one from combined acute TCMR and AMR.

Peripheral blood CD14+CD16+ monocytes after kidney allograft transplantation

The percentage of peripheral CD14+CD16+ monocytes was found to be downregulated during 7 days after the kidney transplantation in the group of patients without the induction therapy ($p < 0.0005$) and those treated with thymoglobulin ($p < 0.0002$). In patients treated with anti-CD25 antibody basiliximab, the decrease in percentage of CD14+CD16+ reached the minimum after two weeks and the moderate changes did not reach statistical significance ($p = \text{ns}$) (Figures 1 and 2). In most patients, the transient downregulation of CD14+CD16+ subpopulation

was almost adjusted in three months but did not reach the values obtained before the transplantation.

Peripheral blood CD14+CD163+ monocytes after kidney allograft transplantation

The percentage of peripheral CD14+CD163+ monocytes was found to be upregulated during 7 days after the kidney transplantation in the group of patients without the induction therapy ($p < 0.0001$) and those treated with basiliximab ($p < 0.0001$). In patients treated with thymoglobulin, the upregulation in percentage of CD14+CD163+ reach the maximum after two weeks ($p < 0.001$) (Figures 3 and 4). In most patients, the upregulation of CD14+CD163+ subpopulation was almost adjusted in three or six months but did not reach the values obtained before the transplantation. In the pooled group of kidney transplant recipients ($n = 71$), marked upregulation of CD14+CD163 subpopulation is in contrast with minimal changes in whole monocyte population (Figure 5).

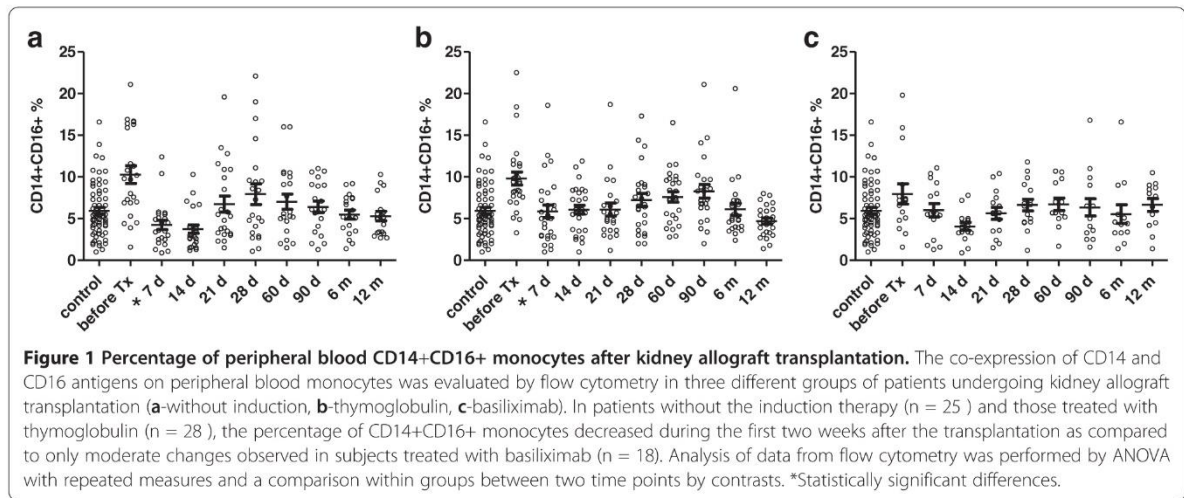
Peripheral blood CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocytes in patients with acute rejection of kidney allograft

Our preliminary data obtained from two patients undergoing acute rejection showed the trend to upregulation of CD14+CD16+ monocytes in these subjects as demonstrated in a case report of two study subjects (Figure 6).

"In vitro" effect of immunosuppressives on phenotype of human monocytes

In order to assess the direct effect of immunosuppressives, the proportions of monocyte subpopulations CD14+CD16+ and CD14+CD163+ were evaluated in cultured PBMC exposed to rATG, basiliximab, and methylprednisolone. Exposition of PBMC to rATG (Figure 7a) reduced the percentage of CD14+CD16+ monocytes in 1 hour and the decline continued until 48 hours. In contrast, percentage of CD14+CD16+ monocytes in control samples gradually grew up to 75% from initial 10% of cells ($p < 0.05$). The data suggest that rATG is effective already at very low concentrations. In contrast, basiliximab does not affect the proportions of CD14+CD16+ monocytes at all (Figure 7b). Methylprednisolone (Figure 7c) upregulated the percentage of CD14+CD16+ monocytes after 48 hours ($p < 0.05$) compared to the control.

Monocytes incubated with rATG (Figure 8a) upregulated the expression of CD163+ after 6 hours and the proportion of CD14+CD163+ monocytes increased from 6% at the time point 0 h to 50% at the time point 48 h ($p < 0.01$). In control cultures of PBMCs, the percentage of CD14+CD163+ monocytes reach the maximum of 20% after 48 hours ($p < 0.05$). Basiliximab at the all concentrations and time points did not modulate the



development of CD14+CD163+ monocytes (Figure 8b). Methylprednisolon (10 and 100 µg) has been shown to be the strongest inducer of CD14+CD163+ monocytes and upregulated their proportions from 6% to 90% in the first 6 hours ($p < 0.05$) (Figure 8c). Concentrations higher than 1000 µg/ml were found to be toxic, the results of cell viability tests are shown in the Table 2.

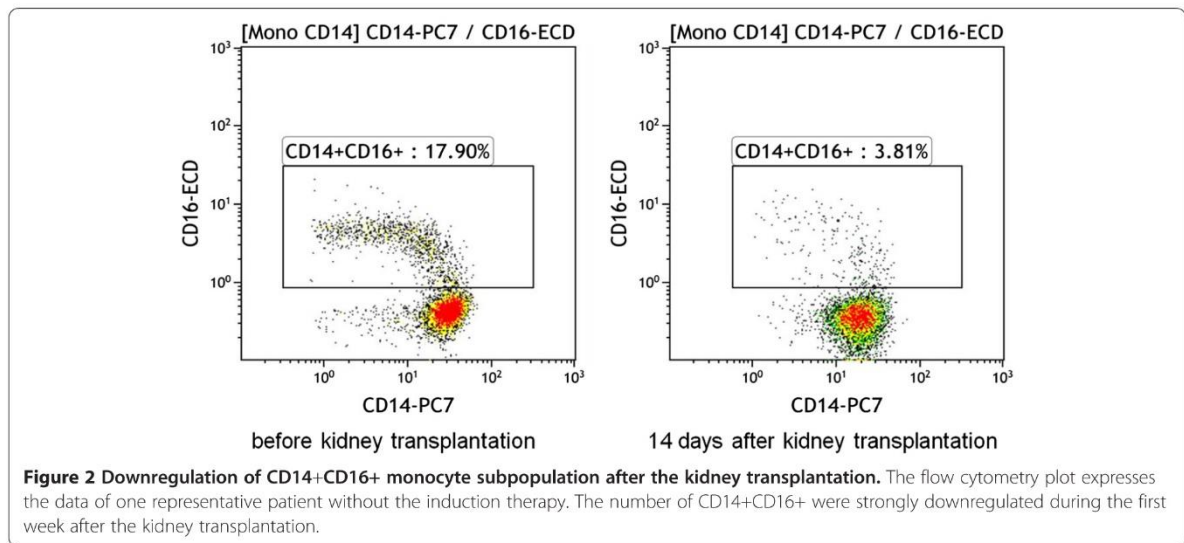
Peripheral blood monocyte expression of CD36 and CD74 after kidney allograft transplantation

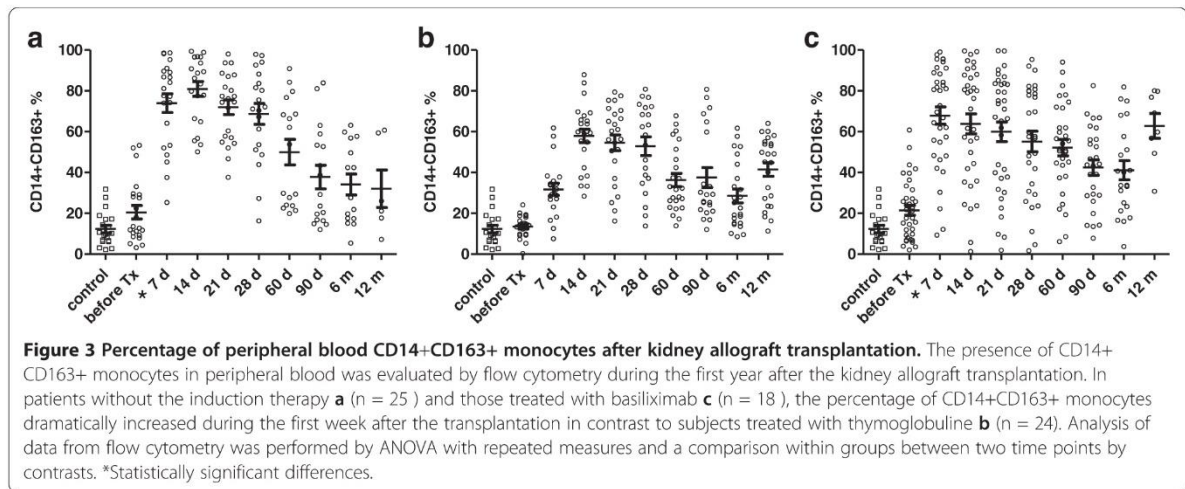
Constitutive CD36 expression was found in more than 98% of monocytes without any dynamic changes during the post-transplantation period. Similarly, a high density CD74 expression was present in all peripheral blood monocytes without any changes. Proportions of peripheral blood monocytes in the frame of whole

blood count were not affected during the 12 months period after the kidney allograft transplantation (not shown).

Discussion

Our data suggest that kidney allograft transplantation is associated with evident shifts in proportions of specific monocyte subpopulations CD14+CD16+ and CD14+CD163+ and these changes are partially affected by the immunosuppressive regime used. During the first week after the transplantation, the proportion of intermediate/nonclassical CD14+CD16+ monocytes is downregulated which might be due to their trafficking to the graft or by their selective deletion. Obviously, no bioptical data to prove the presence of CD14+CD16 monocytes in the graft immediately after the surgery were obtainable from ethical reasons.

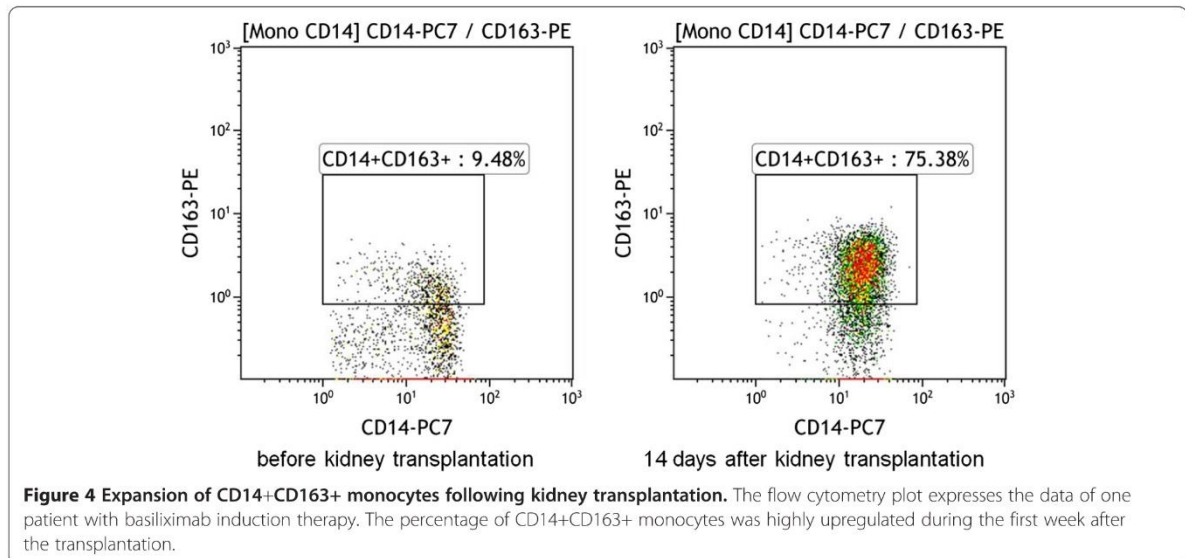




Nonetheless, selective deletion of CD14+CD16+ monocytes seems to us more relevant since recent data showing that these monocytes are senescent [24] also indirectly suggest that they might be more sensitive to the aggressive environment of a “cytokine storm” associated with the ischemia/reperfusion injury. The initial values of CD14+CD16+ monocytes before the kidney transplantation were higher as compared to values in healthy subjects reflecting the end stage kidney disease [14].

The effect of different treatment regimes was also observed. A statistically significant decrease of the CD14+CD16+ monocytes in the first week after transplantation was observed in patients without induction therapy and those treated with rATG. Patients treated with basiliximab achieved only moderate decrease after

two weeks of treatment. In this respect, we also demonstrated the direct effect of rATG on the decrease of CD14+CD16+ monocytes in cultured PBMCs while basiliximab did not affect this monocytic subpopulation “in vitro”. The reason for the different cellular response may be due to different mechanism of action of rATG and basiliximab. Polyclonal rATG leads to an immediate targeted depletion of T lymphocytes together with evident effects on other immune cells while basiliximab binds to the α -chain of IL-2R (CD25) on the T lymphocyte surface, so that T lymphocytes are not able to bind to IL-2. This treatment affects mainly IL-2 and T lymphocyte mediated immune responses and probably does not directly affect monocytes [25].



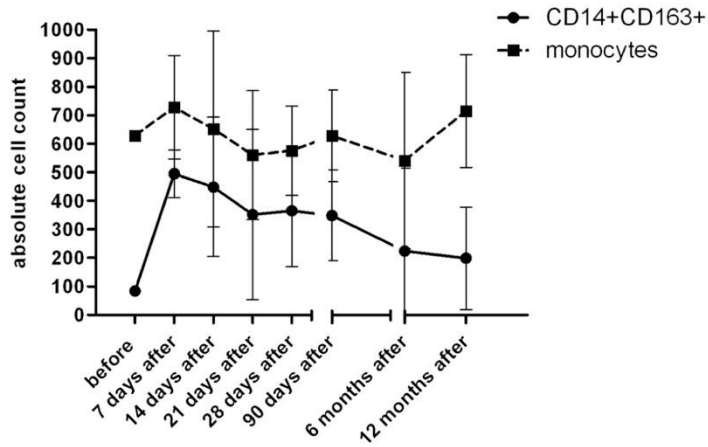


Figure 5 Proportional changes of CD14+CD163+ subpopulation as compared to the whole population of peripheral blood monocytes. The absolute numbers of peripheral blood monocytes and their CD14+CD163 subpopulation were monitored during the first year following kidney allograft transplantation (n = 71). The early massive upregulation of CD14+CD163+ subpopulation is in a contrast with only moderate changes observed in whole population of peripheral blood monocytes (absolute numbers of monocyte subpopulations are calculated from the total number of leukocytes and are expressed as number of cells *10⁹/l).

Early upregulation of CD163 expression might be a result of prednisolone treatment as a part of standard immunosuppressive regimes since in vitro, the induction of this molecule on monocytes by glucocorticoids has been already documented [19] and our data confirmed early induction of CD163 expression on monocytes in response

to methylprednisolone. In addition to increasing the number of monocytes expressing CD163, methylprednisolone also upregulated the density CD163 on the cells surface.

Surprisingly, the delayed effect of CD163 induction in thymoglobulin-treated patients was associated with its prolonged expression and might be regulated by other

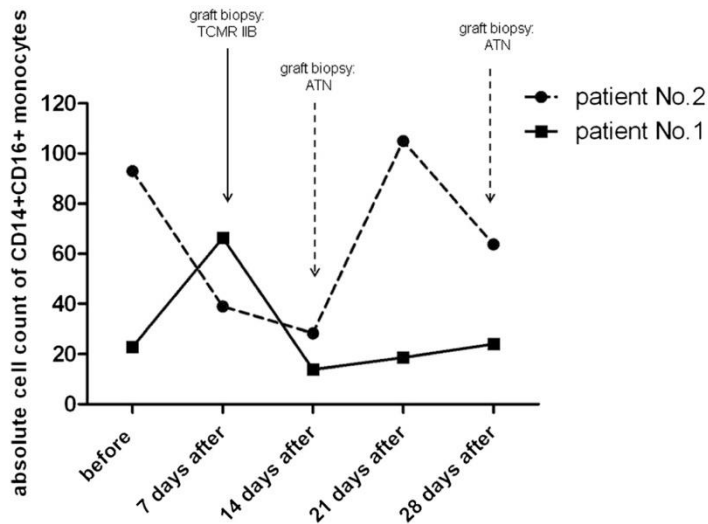
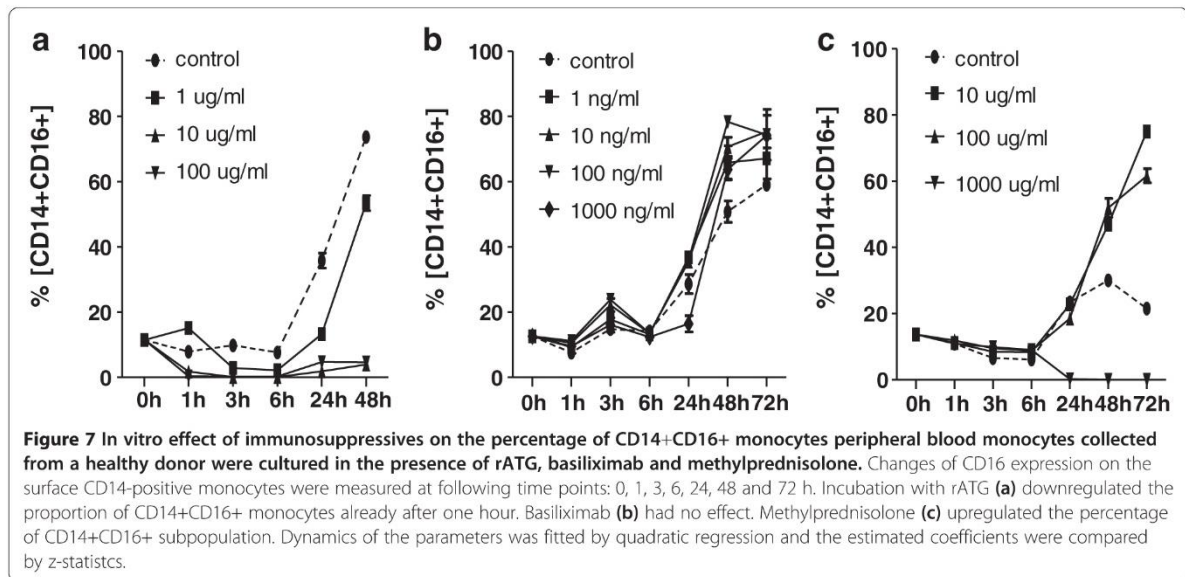


Figure 6 Case reports of two patients with complicated outcome of kidney allograft transplantation associated with changes of CD14+CD16+ subpopulation. Patient No.1 is a 56-year old male with delayed graft function and diagnosed acute cellular rejection IIB in early phase following kidney allograft transplantation, treated successfully with thymoglobulin. Patient N. 2 is a 51-year old male with C4d negative humoral rejection (FACSXM positive, presence of MICA antibodies) diagnosed one month after the transplantation. After changing of immunosuppression and subsequent IVIG therapy, the kidney functions became stable. In both cases, the clinical status of patients correlated with proportions of CD14+CD16+ monocytes. TCMR = T cell-mediated rejection, ATN = acute tubular necrosis (absolute numbers of monocyte subpopulations are calculated from the total number of leukocytes and are expressed as number of cells *10⁹/l).



induced cells since it lasted for 3 months after the last treatment with this polyclonal antibody. The initial proportions of CD14+CD163+ monocytes did not differ from values of healthy subjects.

Simultaneously “in vivo”, we found a decreased number of total peripheral blood monocytes one week after transplantation in the patients group receiving rATG. The ability of rATG to induce apoptosis of monocytes has been demonstrated. It is assumed that monocyte depletion by rATG might contribute to the prevention of GVHD [26]. rATG effect on the monocytes function, including the expression of surfaces markers and production of cytokine spectrum, can be expected.

Furthermore, we have analyzed a potential relationship between the proportion of monocyte subpopulations and PRA values and have not found any correlations (data not shown). In few patients undergoing acute rejection of kidney allograft, the intermediate/nonclassical CD14+CD16+ monocytes are upregulated and their capacity to release cytokines like TNF alpha and IL-1 beta might be indirectly involved in downregulation of the CD14+CD163+ phenotype. In human monocytes, CD163 expression is known to be downregulated in vitro by IFN gamma [27], a cytokine associated with Th1 mediated rejection mechanisms. Our data did not support this pattern of regulation in kidney transplant patients.

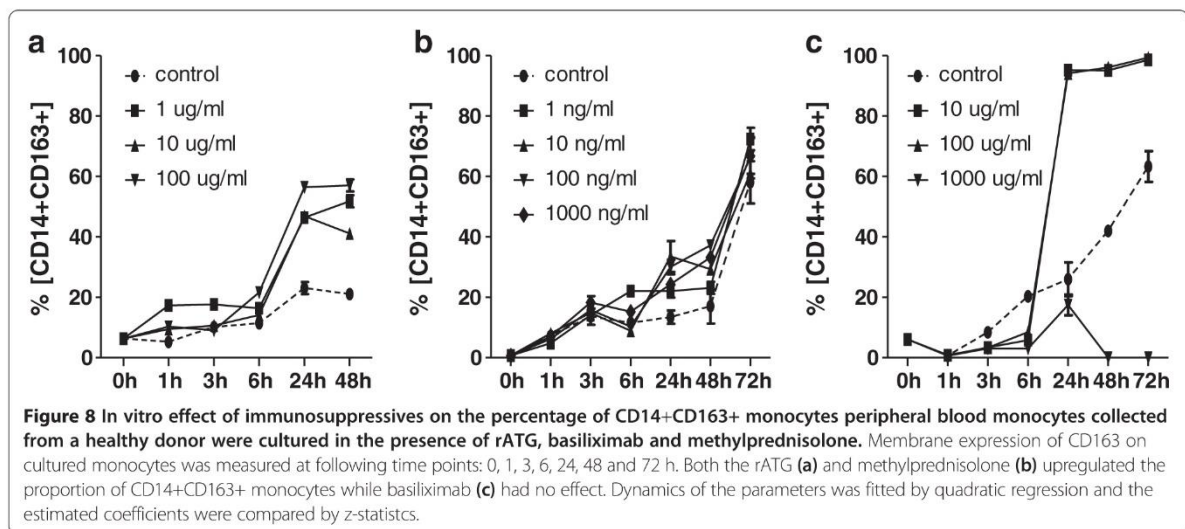


Table 2 Viability of the cells (“in vitro” experiments)

		rATG				
Hour		Control	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	
	0	94,1 ± 1,0	96,1 ± 1,3	96,3 ± 1,8	95,1 ± 2,2	
	24	97,4 ± 1,8	95,9 ± 1,8	94,2 ± 3,2	93,2 ± 1,9	
	48	93,2 ± 2,6	94,6 ± 2,1	95,6 ± 1,9	92,7 ± 1,3	
	72	97,3 ± 1,4	96,1 ± 2,5	94,8 ± 2,1	95,2 ± 1,2	
		Basiliximab				
Hour		Control	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
	0	96,1 ± 1,1	95,8 ± 1,9	95,3 ± 1,6	93,6 ± 0,8	93,5 ± 1,8
	24	97,3 ± 2,1	92,1 ± 2,1	96,2 ± 1,1	94,6 ± 1,2	93,8 ± 2,5
	48	97,2 ± 1,8	96,4 ± 2,2	98,1 ± 0,5	93,8 ± 2,1	95,1 ± 1,8
	72	96,3 ± 2,4	93,9 ± 1,9	95,6 ± 2,1	94,3 ± 3,1	96,2 ± 1,3
		Methylprednisolone				
Hour		Control	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml	
	0	95,1 ± 1,3	95,1 ± 1,2	96,9 ± 2,1	84,2 ± 3,8	
	24	96,9 ± 2,5	95,8 ± 1,8	96,9 ± 1,8	33,4 ± 8,9	
	48	96,7 ± 1,3	96,2 ± 2,2	95,1 ± 2,1	38,1 ± 10,3	
	72	95,6 ± 2,1	97,0 ± 1,9	95,3 ± 2,3	31,1 ± 10,2	

Viability of the cells was measured on the bases of penetration of trypan blue into the cells.

With respect to standardization procedures, our experiments confirmed the differences in domain specific binding of anti-CD163 antibodies which are responsible for published discrepancies in CD163 monocyte positivities [28]. We tested two different clones (RM3/1 and GHI61) for the detection of CD163 but only GHI61 clone bound to the surface of blood monocytes in contrast to the epitope recognized by clone RM3/1 expressed exclusively on the surface of macrophages and completely absent in monocytes (data not shown).

Conclusions

Both the initial phase of kidney transplantation immediately after the graft reperfusion and acute rejection process are associated with multiple immunological reactions and changes in the proportions of monocyte subpopulations might be one of the key factors. Estimating the number of peripheral intermediate CD14+CD16+ and “anti-inflammatory” CD14+CD163+ monocytes might be one of new potentially perspective laboratory parameters to evaluate immune responses in kidney transplant recipients. The induction of immunosuppressive CD14+CD163+ monocytes and downregulation of proinflammatory intermediate/nonclassical CD14+CD16+ monocytes might play a protective role in the early phase after kidney transplantation. On the other hand, we have not performed any functional tests to confirm immunosuppressive or proinflammatory properties of these cells in this study.

Abbreviations

LPS: Lipopolysaccharide; TB: Tuberculosis; TNF alpha: Tumor necrosis factor- alpha; IL-10: Interleukin 10; CNi: Calcineurin inhibitor; MMF: Mycophenolate mofetil; PRA: Panel reactive antibodies; rATG: Thymoglobulin; SCR: Serum creatinine; DGF: Delayed graft function; eGFR: estimated glomerular filtration rate; TCMR: T cell-mediated rejection; AMR: Antibody-mediated rejection; PE: Phycocerythrin; PC7: Phycocerythrin-cyanine 7; PC5: Phycocerythrin-cyanine 5; FITC: Fluorescein isothiocyanate; IL-1 beta: Interleukin-1 beta; IFN gamma: Interferon gamma.

Competing interests

The author declares that they have no competing interests.

Authors' contributions

AS performed flow cytometry analysis, analyzed data, wrote the paper. EK collected and analyzed clinical data. EB performed flow cytometry analysis, analyzed data, made graphs. JS collected and analyzed clinical data. OV designed study, analyzed data. VL completed statistical analysis. IS designed study, analyzed data, wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

Authors are indebted to Eva Faberova and Adela Sajdlova for their excellent technical assistance.

Funding sources

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic No: P301/11/1568 and by MH CZ - DRO (“Institute for Clinical and Experimental Medicine – IKEM, IN 00023001”).

Author details

¹Department of Clinical and Transplant Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, Prague 4 140 21, Czech Republic. ²Transplant Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic. ³Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic. ⁴Department of Statistics, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Received: 19 July 2013 Accepted: 29 January 2014
Published: 6 February 2014

References

1. Girlanda R, Kleiner DE, Duan Z, Ford EA, Wright EC, Mannon RB, Kirk AD: **Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection.** *Am J Transplant* 2008, **8**(3):600–607.
2. Hribova P, Lacha J, Kotsch K, Volk HD, Brabcova I, Skibova J, Vitko S, Viklicky O: **Intrarenal cytokine and chemokine gene expression and kidney graft outcome.** *Kidney Blood Press Res* 2007, **30**(5):273–282.
3. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW: **Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood.** *Blood* 1989, **74**(7):2527–2534.
4. Ziegler-Heitbrock L: **The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation.** *J Leukoc Biol* 2007, **81**(3):584–592. Epub 2006 Nov 2029.
5. Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Fingerle G, Schlunck T, Pforte A, Blumenstein M, Haas JG: **Small (CD14+/CD16+) monocytes and regular monocytes in human blood.** *Pathobiology* 1991, **59**(3):127–130.
6. Komohara Y, Hirahara J, Horikawa T, Kawamura K, Kiyota E, Sakashita N, Araki N, Takeya M: **AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype.** *J Histochem Cytochem* 2006, **54**(7):763–771. Epub 2006 Mar 2003.
7. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW: **Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations.** *J Leukoc Biol* 2000, **67**(5):699–704.
8. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L: **The proinflammatory CD14+CD16+ DR++ monocytes are a major source of TNF.** *J Immunol* 2002, **168**(7):3536–3542.
9. Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C: **Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells.** *Curr Opin Immunol* 2008, **20**(1):52–60. Epub 2007 Dec 2021.
10. Grip O, Bredberg A, Lindgren S, Henriksson G: **Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2007, **13**(5):566–572.
11. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H: **CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(10):2578–2586.
12. Okamoto H, Mizuno K, Horio T: **Circulating CD14+ CD16+ monocytes are expanded in sarcoidosis patients.** *J Dermatol* 2003, **30**(7):503–509.
13. Waldo SW, Li Y, Buono C, Zhao B, Billings EM, Chang J, Kruth HS: **Heterogeneity of Human Macrophages in Culture and in Atherosclerotic Plaques.** *Am J Pathol* 2008, **5**:5.
14. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, Roth D, Ulrich C, Fliser D, Heine GH: **CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease.** *Eur Heart J* 2011, **32**(1):84–92.
15. Ulrich C, Heine GH, Gerhart MK, Kohler H, Girndt M: **Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients.** *Am J Transplant* 2008, **8**(1):103–110. Epub 2007 Nov 2012.
16. Fabrick BO, Dijkstra CD, van den Berg TK: **The macrophage scavenger receptor CD163.** *Immunobiology* 2005, **210**(2–4):153–160.
17. Moreno JA, Munoz-Garcia B, Martin-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Orbe J, Paramo JA, Ortega L, Egidio J, Blanco-Colio LM: **The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis.** *Atherosclerosis* 2009, **207**(1):103–110.
18. Fabrick BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Schornagel K, Vloet RP, Dijkstra CD, van den Berg TK: **The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria.** *Blood* 2009, **113**(4):887–892.
19. Maniecki MB, Moller HJ, Moestrup SK, Moller BK: **CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes.** *Immunobiology* 2006, **211**(6–8):407–417.
20. Mayer A, Lee S, Jung F, Grutz G, Lendlein A, Hiebl B: **CD14+ CD163+ IL-10+ monocytes/macrophages: Pro-angiogenic and non pro-inflammatory isolation, enrichment and long-term secretion profile.** *Clin Hemorheol Microcirc* 2010, **46**(2–3):217–223.
21. Paulsson JM, Held C, Jacobson SH, Lundahl J: **In vivo extravasated human monocytes have an altered expression of CD16, HLA-DR, CD86, CD36 and CX(3)CR1.** *Scand J Immunol* 2009, **70**(4):368–376.
22. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zernecke A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, et al: **MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment.** *Nat Med* 2007, **13**(5):587–596.
23. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, et al: **Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN').** *Am J Transplant* 2007, **7**(3):518–526.
24. Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R, Carracedo J: **Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity.** *J Immunol* 2011, **186**(3):1809–1815.
25. Vincenti F: **Current use and future trends in induction therapy.** *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2005, **16**:506–513.
26. Grüllich C, Ziegler C, Finke J: **Rabbit anti T-lymphocyte globulin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cell compartments and leukemia cells, while hematopoietic stem cells are apoptosis resistant.** *Biol Blood Marrow Transpl* 2009, **15**:173–182.
27. Ritter M, Buechler C, Langmann T, Orso E, Klucken J, Schmitz G: **The scavenger receptor CD163: regulation, promoter structure and genomic organization.** *Pathobiology* 1999, **67**(5–6):257–261.
28. Maniecki MB, Etzerodt A, Moestrup SK, Moller HJ, Graversen JH: **Comparative assessment of the recognition of domain-specific CD163 monoclonal antibodies in human monocytes explains wide discrepancy in reported levels of cellular surface CD163 expression.** *Immunobiology* 2011, **216**(8):882–890.

doi:10.1186/1471-2172-15-4

Cite this article as: Sekerkova et al.: CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation. *BMC Immunology* 2014 **15**:4.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5.4. Biomarkery tolerance spojené s funkcí B lymfocytů

Úvod

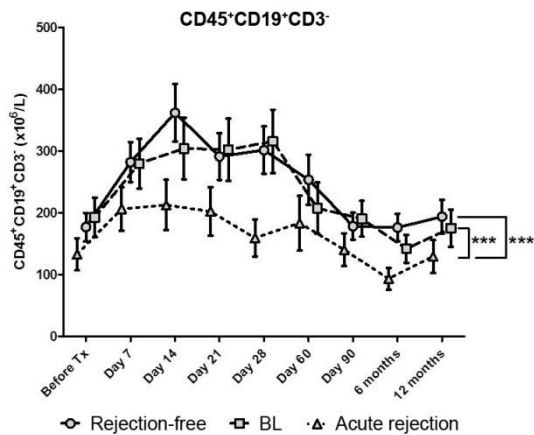
Nedávno byly identifikovány tzv. molekulární podpisy (“molecular signatures“) u pacientů s operační tolerancí s dlouhodobě fungujícím ledvinným štěpem bez nutnosti imunosupresivní léčby. Zatím je ale jen málo známo o expresi těchto genů asociovaných s tolerancí u pacientů se stabilní funkcí štěpu, kteří setrvávají na imunosupresivní léčbě. Tato práce byla úplně první, která validovala pozorování od pacientů s operační tolerancí (bez imunosupresivní léčby) v prospektivní kohortě nemocných léčených standardní imunosupresí.

Metody

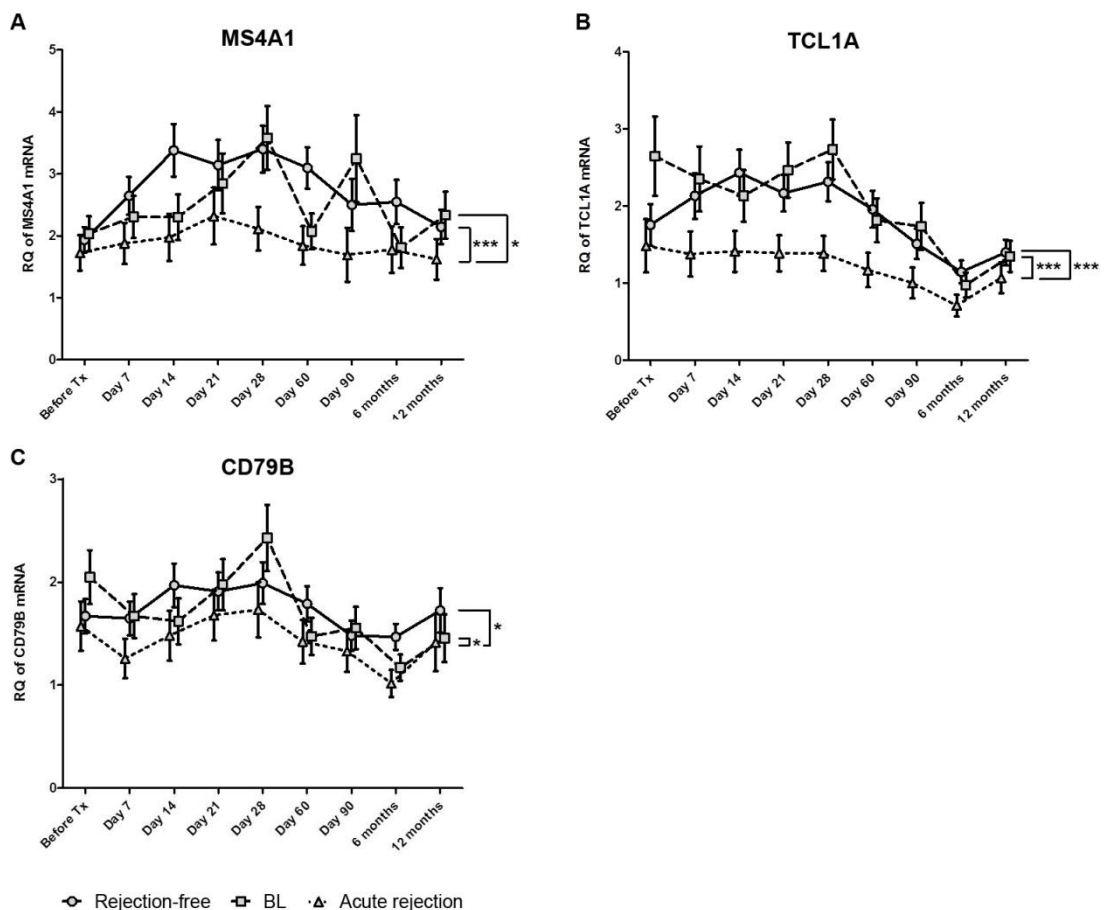
V této prospektivní studii byly v periferní krvi měřeny expresní profily osmi vybraných genů rozdílně exprimovaných v krvi pacientů s operační tolerancí (*MS4A1*, *CD79B*, *TCL1A*, *TMEM176B*, *FOXP3*, *TCAIM* (dříve *TOAG-1*), *MAN1A1*, a *TLR5*) a počty CD45⁺CD19⁺CD3⁻ B lymfocytů u 67 příjemců transplantované ledviny před transplantací a 7., 14., 21., 28., 60. a 90. den a 6 a 12 měsíců po transplantaci. Expres těchto genů byla dále hodnocena v renální tkáni získané biopsií štěpů. Expresní profily a počty B lymfocytů byly porovnány mezi skupinami pacientů rozdělených dle bioptických nálezů během jednorozhodného sledování: s akutní rejekcí (AR, klinickou či subklinickou, n=14), s hraničními změnami (borderline changes, BL, n=20) a bez rejekce (rejection-free, RF, n=33). Pro statistickou analýzu longitudinálních dat byl použit zobecněný smíšený lineární model pro opakovaná měření s gama regresí a s adjustací na použitou indukční terapii; pro analýzu dat z biopsií byl použit Kruskal-Wallisův test.

Výsledky

V průběhu sledování byly pozorovány signifikantně vyšší počty periferních B lymfocytů u pacientů bez rejekce a pacientů s hraničními změnami v porovnání s pacienty s rejekcí. Expres genů *MS4A1* (*CD20*), *TCL1A*, *CD79B*, *TCAIM* a *FOXP3* byly signifikantně vyšší u pacientů bez rejekce a s hraničními změnami v porovnání se skupinou s rejekcí. Nejvyšší rozdíly byly pozorovány během prvních 3 měsíců. Naopak *TMEM176B* (*TOR1D*) byl up-regulován ve skupině s rejekcí. Ve štěpech byly nejvyšší exprese *TCAIM* pozorovány u pacientů bez rejekce.



Obrázek 5.10 Absolutní počty periferních B lymfocytů ($CD45^+CD19^+CD3^+$). B lymfocyty byly měřeny pomocí průtokové cytometrie v periferní krvi pacientů s diagnózou akutní rejekce (AR, trojúhelníky na tečkované čáře), hraniční změny (BL, čtverce na čárkované čáře) nebo bez rejekce (RF, kroužky na plné čáře) během jednoročního sledování. Data jsou vyjádřena jako odhadnuté marginální průměry \pm SEM.



Obrázek 5.11 Relativní množství (RQ) mRNA genů MS4A1, TCL1A a CD79B. RQ byla měřena pomocí qRT-PCR v periferní krvi pacientů s diagnózou akutní rejekce (AR, trojúhelníky na tečkované čáře), hraniční změny (BL, čtverce na čárkované čáře) nebo bez rejekce (RF, kroužky na plné čáře) během jednoročního sledování. Data jsou vyjádřena jako odhadnuté marginální průměry \pm SEM.

Závěr a shrnutí studie

Naše pozorování naznačují, že „B buněčný podpis“ známý od pacientů po transplantaci ledviny s operační tolerancí bez nutnosti imunosupresivní léčby, je také spojen s kontrolovanou aloimunitní odpovědí u pacientů po transplantaci ledviny na standardní imunosupresi. Pokud je nám známo, je tato prospektivní observační studie první, která validovala asociaci a domnělou protektivní roli genů spojených s tolerancí a funkcí B lymfocytů u pacientů po transplantaci ledviny, kteří jsou ještě léčeni standardní imunosupresivní terapií. Zda tato pozorování budou tvořit základ pro jednodušší a bezpečnější minimalizační (nebo eliminační) strategii léčby bude moci být zodpovězeno po provedení prospektivních intervenčních studií založených na biomarkerech.

Práce byla publikována v časopise Transplantation:

Viklicky O, Krystufkova E, Brabcova I., Sekerkova A, Wohlfahrt P, Hribova P, Urbanova M, Sawitzki B, Slatinska J, Striz I, Volk HD, Reinke P. **B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients.** Transplantation. 2013 Jan 15;95(1):148-54. IF 3.535

B-Cell-Related Biomarkers of Tolerance are Up-Regulated in Rejection-Free Kidney Transplant Recipients

Ondrej Viklicky,^{1,2,7} Eva Krystufkova,¹ Irena Brabcova,¹ Alena Sekerkova,³ Peter Wohlfahrt,⁴ Petra Hribova,¹ Mariana Wohlfahrtova,^{1,2} Birgit Sawitzki,⁵ Janka Slatinska,² Ilja Striz,³ Hans-Dieter Volk,⁵ and Petra Reinke⁶



Background. Molecular signatures have recently been identified in operationally tolerant long-term kidney transplant patients; however, their expression in patients on immunosuppression remains unclear.

Methods. In this prospective study, the gene expression profiles of eight selected tolerance-associated genes (*MS4A1*, *CD79B*, *TCL1A*, *TMEM176B*, *FOXP3*, *TOAG-1*, *MAN1A1*, and *TLR5*) in the peripheral blood of 67 kidney transplant recipients at days 0, 7, 14, 21, 28, 60, 90, and at 6 and 12 months, and in graft biopsies were measured. Similarly, using flow cytometry, CD45⁺CD19⁺CD3⁻ B-cell counts were evaluated in the follow-up. Expression patterns were compared among patients with biopsy-proven acute rejection, borderline changes, and in rejection-free patients. A generalized linear mixed model with gamma distribution for repeated measures adjusted for induction therapy was used for statistical analysis of longitudinal data and Kruskal-Wallis test for case biopsy data.

Results. Compared to patients with rejection, a significantly higher number of peripheral B cells were observed during follow-up in rejection-free patients and in patients with borderline changes. Gene expression patterns of *MS4A1* (*CD20*), *TCL1A*, *CD79B*, *TOAG-1*, and *FOXP3* genes were significantly higher in rejection-free patients as compared to rejection group with the highest differences during the first 3 months. In contrast, *TMEM176B* (*TOR1D*) was up-regulated in the rejection group. Similar trends were also observed between patients with borderline changes and acute rejection. Higher intragraft expression of *TOAG-1* was observed in rejection-free patients.

Conclusions. These observations suggest an association of B-cell signatures, seen also in drug-free tolerant patients, with controlled alloimmune response.

Keywords: Kidney transplantation, Tolerance, B cell, TCL-1, CD20, Rejection.

(*Transplantation* 2013;95: 148–154)

Successful, long-term kidney transplants have been shown to be associated with reduced alloimmune response. However, immunosuppression therapies can be associated

with several side effects (1), and for many patients, triple drug regimens are not necessary because of weak alloreactive responses. Therefore, the development of reliable tests

This study was supported by a grant from the Internal Grant Agency from the Ministry of Health of the Czech Republic, no. IGA MZCR NS 10517-3/2009, and by the Grant Agency of the Czech Republic, grant no. P301/11/1568.

O.V. is a recipient of a grant from the Internal Grant Agency from the Ministry of Health of the Czech Republic (No. IGA MZCR NS 10517-3/2009) and a grant from the Grant Agency of the Czech Republic (No. P301/11/1568). O.V., B.S., H.-D.V., and P.R. are supported in part also by RISE (EU FP6 program) and Bio-DrIM (EU FP7 program).

The authors declare no conflicts of interest.

¹ Transplant Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

² Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

³ Department of Clinical and Transplant Immunology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

⁴ Department of Preventive Cardiology, Cardiology Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

⁵ Institute of Medical Immunology and Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité University Medicine, Berlin, Germany.

⁶ Department of Nephrology and Internal Intensive Care and Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité University Medicine, Berlin, Germany.

⁷ Address correspondence to: Ondrej Viklicky, M.D., Ph.D., Department of Nephrology, Transplant Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958, 14021 Prague, Czech Republic.

E-mail: ondrej.viklicky@medicon.cz

O.V., H.-D.V., and P.R. participated in designing the research. O.V., E.K., and B.S. participated in writing the paper. O.V., I.B., A.S., P.H., M.W., J.S., and I.S. participated in performing the research. O.V., E.K., and P.W. participated in analyzing the data.

Supplemental digital content (SDC) is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML text of this article on the journal's Web site (www.transplantjournal.com).

Received 3 August 2012. Revision requested 23 August 2012.

Accepted 10 October 2012.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/13/9501-148

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182789a24

that may help identify patients suitable for drug minimization is needed.

It has been shown that some immune cells exhibit regulatory functions (2–5) necessary for alloresponse quiescence. While more attention has been focused on regulatory T-cell function, little is known regarding B cells in the context of induction and maintenance of transplantation tolerance. It was thought that B cells were primarily associated with development of antibody-mediated immune response, and B-cell clusters in kidney graft tissue were shown to be associated with poor prognosis (6). More recently, and contrary to this observation, several groups including ours have found B-cell signatures to be associated with better early rejection outcomes (7, 8). Interestingly, operationally tolerant patients who had stable graft function despite the absence of immunosuppressive therapy for more than 1 year presented with distinct molecular signature. Most prominent and reproducible in different studies and crossover validations was the relation between operational tolerance and enhanced expression of B-cell-related transcripts as well as enhanced flow cytometric B-cell counts in the peripheral blood compared to patients with chronic rejection (9–11). However, little is known about the expression of B-cell signatures in stable transplant patients who are still on immunosuppression, and particularly about the kinetics of this particular expression pattern posttransplantation. Therefore, we performed a 12-month prospective observational study to monitor known markers associated with kidney transplant operational tolerance. Here, we demonstrated that B-cell-related and operational tolerance-associated transcripts were up-regulated in peripheral blood in rejection-free kidney transplant recipients as early as within the first year posttransplantation.

RESULTS

Using flow cytometry and quantitative real-time RT-PCR, peripheral lymphocyte subsets and mRNA expression profiles of eight operational tolerance-associated genes were prospectively monitored in peripheral blood in 67 patients during the first 12 months posttransplantation.

After 1 year follow-up, the patients were categorized into (1) rejection-free group (n=33 [49.2%]), patients without any positive protocol or case biopsy; (2) acute rejection group (n=14 [20.9%]), patients who experienced clinical or subclinical acute rejection confirmed in case biopsies or 3-month protocol biopsies, respectively; and (3) borderline changes group (n=20 [29.9%]), patients in whom borderline changes were confirmed in case biopsies and 3-month protocol biopsies. Acute rejection (diagnosed histologically according Banff '05 classification) group consisted from T-cell-mediated rejection (TCMR) IA in three patients, TCMR IB in one patient, TCMR IIA in two patients, TCMR IIB in two patients, antibody-mediated rejection (ABMR) in four patients, and combined TCMR IIA plus ABMR in another two patients. Rejection episodes occurred at median 7.5 (min 5; max 219) days after transplantation. There was one steroid-resistant rejection treated thereafter with rabbit antithymocyte globulin (rATG) successfully. All other rejections responded to given therapy. Characteristics of all studied groups are shown in Table 1.

Tolerance Markers in Peripheral Blood

The constantly higher relative and absolute flow cytometric CD19⁺ B-cell counts were observed in peripheral blood samples examined from patients without rejection and in patients with borderline changes compared to patients with acute rejection (both $P < 0.0001$; Fig. 1). During

TABLE 1. Study group characteristics

	Rejection free	Borderline changes	Rejection	P
Number	33	20	14	
Clinical/subclinical histological findings	—	11/9	10/4	ns ^b
Gender (M/F)	16/17	6/14	4/10	ns ^b
Recipient age (years) ^a	55 [35; 68]	47 [21;70]	58 [32; 78]	<0.05 ^{c,d}
Donor age (yr) ^a	46 [16; 75]	57 [36; 74]	57 [22; 71]	<0.05 ^{c,e}
Dialysis vintage (yr) ^a	2.0 [0.2; 6.4]	1.7 [0.6; 5.8]	2.9 [0.6; 9.4]	ns ^c
Retransplantation (n)	9	4	3	ns ^b
HLA MM ^a	3 [1; 5]	3 [2; 6]	4 [1;5]	<0.05 ^{c,f}
PRA (%) ^a	32 [0; 96]	12 [2; 86]	28 [0; 82]	ns ^c
CIT (hr) ^a	16.4 [7.7; 20.7]	17.0 [12.4; 21.0]	15.5 [10.8; 20.8]	ns ^c
Induction (n/%)	23/69.7	13/65.0	10/71.4	ns ^b
rATG (n/%)	16/48.5	5/25.0	5/35.7	ns ^b
basiliximab (n/%)	7/21.2	8/40.0	5/35.7	ns ^b
TAC/CsA (n)	32/1	19/1	12/2	ns ^b
DGF	5	8	8	<0.05 ^b

^a Median [min; max].

^b Chi-square test P value.

^c Kruskal-Wallis test P value.

Dunn's Multiple Comparison Test: ^dSignificant difference between borderline changes and the rejection group, ^esignificant differences between the rejection-free and the borderline change group, and ^fsignificant differences between the rejection-free and the rejection group.

Basiliximab, anti-IL-2 receptor alpha monoclonal antibody; CIT, cold ischemic time; CsA, cyclosporin A; DGF, delayed graft function; HLA MM, HLA mismatch; PRA, historical panel reactive antibodies; rATG, rabbit antithymocyte globulin; TAC, tacrolimus.

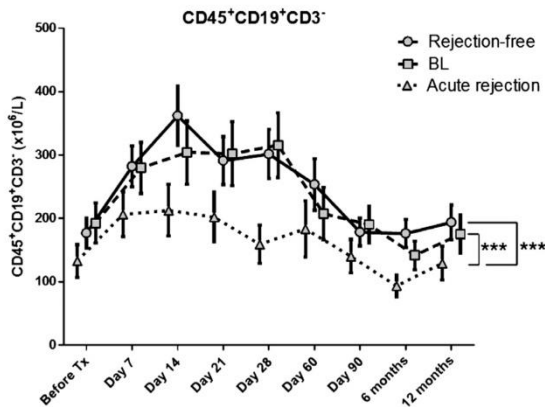


FIGURE 1. Absolute numbers of peripheral B cells ($CD45^+CD19^+CD3^-$). B-cell numbers were measured by flow cytometry in peripheral blood of patients with a diagnosis of acute rejection (dotted line), borderline changes (BL, dashed line), or rejection-free patients (solid line) over a 1-year follow-up period. Higher absolute numbers of peripheral blood B cells were observed in rejection-free patients compared to patients who rejected their grafts. Data are presented as estimated marginal means \pm SEM.

follow-up, all three B-cell-related genes expression levels (*MS4A1*, *TCL1A*, and *CD79B*) were higher in the peripheral blood of rejection-free patients and in patients with borderline changes compared to patients with acute rejection; the differences were more obvious during the first 6 months while at the end of the follow-up the differences were negligible (*MS4A1*, $P<0.0001$ and $P<0.05$, Fig. 2A; *TCL1A*, both $P<0.0001$, Fig. 2B; *CD79B*, both $P<0.05$, Fig. 2C). No significant differences were observed between patients with borderline changes and rejection-free patients.

In contrast, *TMEM176B* (an immature dendritic cell marker, known as TORID) expression was up-regulated in acute rejection patients compared to rejection-free patients ($P<0.05$; Fig. 3A). No significant differences in *TMEM176B* expression were observed between patients with borderline changes or rejection-free patients. Compared to patients with acute rejection, *FOXP3*, a master transcription factor of regulatory T cell, was up-regulated in rejection-free patients ($P<0.0001$) and in patients presenting with borderline changes ($P<0.05$; Fig. 3B). No significant differences in *FOXP3* expression were observed between patients presenting with either borderline changes or rejection-free patients. The *FoxP3*-to-*MAN1A1* ratio was significantly higher in rejection-free patients compared to acute rejection like the *FoxP3* marker alone (not shown).

TOAG-1 expression in rejection-free patients was higher compared to patients presenting with either borderline changes ($P<0.0001$) or acute rejection ($P<0.05$; Fig. 3C). No significant differences in *TOAG-1* expression were observed between patients presenting with borderline changes and acute rejection group individuals. Finally, there were no significant differences in *TLR5* gene expression patterns between groups (data not shown). No significant differences were observed in expression levels of all analyzed genes and in peripheral B-cell counts pretransplantation in any group.

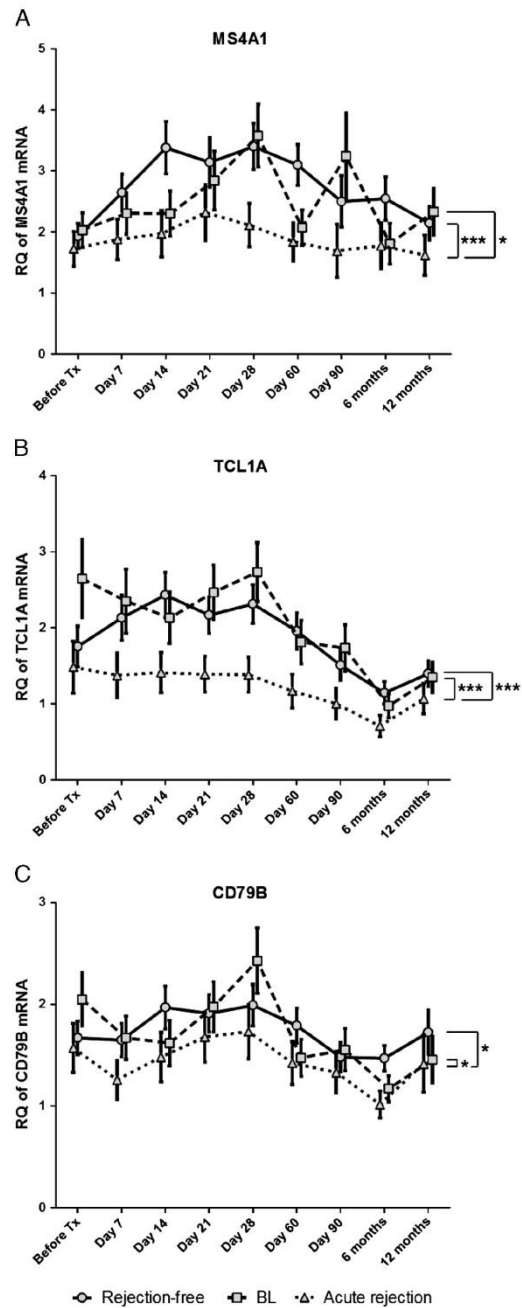


FIGURE 2. Relative quantities (RQ) of *MS4A1*, *TCL1A*, and *CD79B* mRNA measured by qRT-PCR analysis of peripheral blood from patients with a diagnosis of acute rejection (dotted line), borderline changes (BL, dashed line), or rejection-free patients (solid line) over a 1-year follow-up period. The expression levels of three B-cell-related genes *MS4A1* (A), *TCL1A* (B), and *CD79B* (C) were higher in rejection-free patients during the first months posttransplantation. Data are presented as estimated by marginal means \pm SEM.

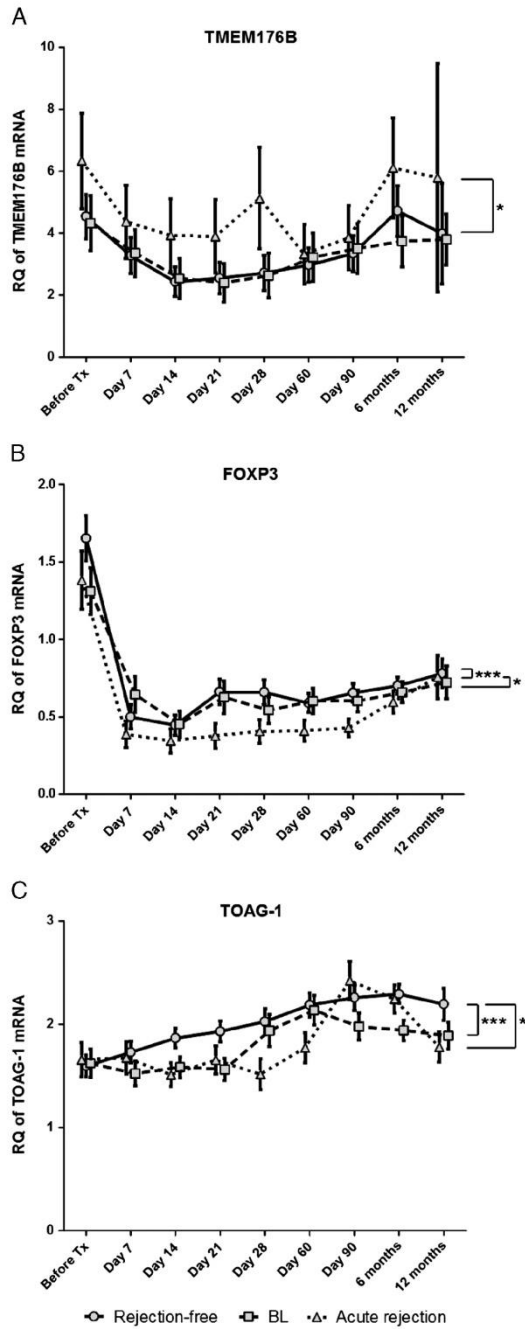


FIGURE 3. Relative quantities (RQ) of *TMEM176B*, *FOXP3*, and *TOAG-1* mRNA measured by qRT-PCR in the peripheral blood of patients with a diagnosis of acute rejection (dotted line), borderline changes (BL, dashed line), or rejection-free patients (solid line) during a 1-year follow-up period. Expression of the *TMEM176B* gene (A) was up-regulated in patients with acute rejection and *FOXP3* (B) and *TOAG-1* (C) were down-regulated in rejection-free patients. Data are expressed as estimated marginal means±SEM.

When discriminating according to the rejection type, the altered expression of B-cell-related genes in peripheral blood were comparable in all rejection groups but were most prominently noticed, along with lowest peripheral B-cell counts, in two patients with repeated T-cell-mediated rejection and combined TCMR (see **Figure S1, SDC**, <http://links.lww.com/TP/A749>).

In the multivariate analysis, number of human leukocyte antigen (HLA) mismatches, age of donor and recipient, induction therapy used, and tacrolimus concentration in blood were associated with expression of studied genes. However, even after adjustment for these factors, the difference between groups with and without rejection episode remains significant.

Tolerance Markers in Kidney Graft Tissues

Little is known about intragraft expression patterns of operational tolerance-associated genes originally described in peripheral blood of operationally tolerant patients. Therefore, we analyzed the expression patterns of the eight operational tolerance-associated genes in specimens from kidney graft case biopsies.

mRNA was isolated in sufficient amounts from kidney graft tissue biopsies in 16 cases in whom rejection was suspected. Biopsies were performed early postsurgery (median 14 days). In seven patients, the case biopsy precluded acute rejection, four patients exhibited borderline changes, and acute rejection was diagnosed in five patients (TCMR in four cases and ABMR in a single case).

Both *TOAG-1* and *TMEM176B* (TORID) genes were up-regulated in biopsies harvested from patients not presenting with acute rejection compared to patients with acute rejection; the differences in *TOAG-1* intragraft expression reached statistical significance ($P < 0.05$, Fig 4). There were no significant differences in the expression profiles of other analyzed genes in the biopsies of patients with or without rejection (data not shown).

DISCUSSION

The aim of this study was to monitor expression patterns of several genes associated with tolerance achieved clinically or experimentally during early-phase posttransplantation in patients with intense immunosuppression in order to see whether tolerance-associated markers might discriminate low or high responders quite early and might possibly guide minimizing immunosuppression. Over a 12-month period, this prospective study identified the up-regulation of several operational tolerance-related genes in the peripheral blood and kidney graft tissues of rejection-free patients. Most differently regulated genes in the peripheral blood were associated with B-lymphocyte function and the most significant differentially expressed transcripts were identified within the first 90 days.

Analyzing the data, there are clear evidences for immunoregulation in rejection-free patients compared to acute rejection group. Regulatory T cells (Treg) have been suggested to play a critical role in immune response regulation (12). FOXP3, the master transcriptional factor associated with Treg cells, was shown to be down-regulated in blood, urine, and

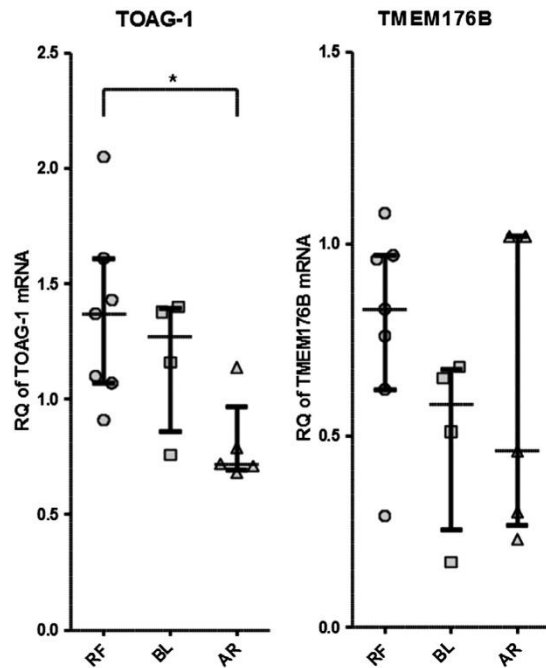


FIGURE 4. Relative quantities (RQ) of *TOAG-1* and *TMEM176B* mRNA were measured in kidney graft biopsy specimens in patients with histological signs of acute rejection (AR), borderline changes (BL), and from rejection-free patients (RF). Significant up-regulation of *TOAG-1* gene in biopsies without acute rejection was observed. Data are expressed as the median and interquartile range.

kidney graft tissues of patients presenting with acute rejection and up-regulated in patients with successful grafts (13–15). A role for both tolerance-associated gene 1 (*TOAG-1*) and the alpha-1,2-mannosidase gene were evaluated in experimental models. Expression of both genes was down-regulated in peripheral blood and graft tissues prior to rejection, suggesting that these markers may be useful for monitoring in clinical transplantation (16). A significant difference in the FOXP3-to- α -1,2-mannosidase expression profile ratio was observed between patients with operational tolerance and chronic rejection (10). In the present study, patients who did not experience acute rejection during the first year had consistently higher *FOXP3* expression levels and similarly FOXP3-to- α -1,2-mannosidase expression ratio (not shown) in peripheral blood. Similarly, the expression pattern of *TOAG-1* gene was constantly increasing during the follow-up in patients without rejection. Moreover, intragraft expression of *TOAG-1* gene was lower during early acute rejection in our study, suggesting this marker to be further validated in the clinical transplantation.

Recently, the composition of the B-cell compartment was shown to be important in determining graft outcome. Naïve and transitory B cells have been suggested to be associated with long-term graft function and operational tolerance; in contrast, memory B cells have been associated with limited graft survival and rejection (10, 17, 18). This study validated the clinical relevance of recently described

B-cell-related markers of operational tolerance as early as within the first year posttransplantation. These genes were down-regulated in peripheral blood during the initial post-transplantation period in patients with acute rejection. Of note, the most reduced flow cytometric peripheral B-cell counts and the expression of B-cell-related transcripts in peripheral blood were observed in two patients with repeated T-cell-mediated rejection and combined ABMR. In the Indices of Tolerance study (10), microarray analysis identified CD79B (a B-lymphocyte antigen receptor complex component that includes surface immunoglobulin) as a top operational tolerance discriminating gene. In our study, there was significantly higher expression of this gene in peripheral blood observed in patients with successful transplants during follow-up.

The most prominent differences in gene expression levels observed in this report were observed in two genes, *MS4A1* and *TCL1*. *MS4A1* (CD20) is a transmembrane protein expressed on premature and mature B cells, and *CD20* transcripts have been shown to be differentially expressed in tolerant kidney transplant recipients compared to other patient groups (10, 11, 19). Similar differences were observed in our study also in T-cell leukemia/lymphoma 1 gene (*TCL1*). The physiological expression of this oncoprotein is limited to the early developmental stages of cells (including immune cells), and its expression was significantly elevated in naïve B cells and B cells with prolonged survival (20, 21). Specifically, expression of *TCL1A* appears to be important because the expression of this protein was highest in immature cells, but low or absent in mature B cells (22). In this study, genes associated with naïve and immature B cells were up-regulated in peripheral blood during several posttransplantation months. Recently, *CD20* and *TCL1* were found to be differentially regulated in tolerant patients not taking immunosuppressive drugs compared to patients with stable grafts (10, 11). Similarly Brouard et al. (19) compared gene expression profiles between operationally tolerant patients and patients with interstitial fibrosis and tubular atrophy and found up-regulation of *CD20* and *TCL1* in tolerant patients.

All three widely cited studies (10, 11, 19) analyzed operational long-term kidney transplant patients, but clearly there was a deficiency in analyzing tolerance markers during early-phase posttransplantation if the patients were still on high-dose immunosuppression and during acute rejection. Thus, our prospective study provided a different perspective. First, markers associated with naïve and immature B cells were consistently up-regulated in peripheral blood during the initial months posttransplantation of rejection-free patients. However, by the end of the follow-up period, these differences nearly disappeared. This might indicate that B-cell expansion is associated with a “quiet” immune system (or even might be responsible for this). At the end of the follow-up, there was a clear trend towards reduced expression of B-cell-related tolerance markers in rejection-free patients rather than their increase in the rejection cohort. Thus, the effect of more intensive antirejection immunosuppression in patients with rejection was likely without any effect on our observation.

One of the genes analyzed, *TMEM176B*, originally described as TORID, was described as overexpressed in tolerated heart allografts in a model of tolerance induced by donor-specific blood transfusion with long-term survival without

signs of chronic rejection (23). Because this molecule was preferentially expressed on resting macrophages and dendritic cells, we can only speculate as to its role in active tolerogenic pathways (23). Our observation demonstrating increased expression of this gene in blood of patients with acute rejection suggested that it was associated with alloantigen presentation and inflammation, suggesting that the tolerogenic potential of this molecule remains to be defined.

In the present study, patients with biopsy-proven borderline changes were analyzed as an independent cohort. Despite the fact that the Banff classification system did not consider borderline changes as rejection, many centers administer i.v. steroids to treat patients presenting with these changes. Recently, it has become clearer that patients presenting with borderline changes represent a nonhomogenous diagnostic group presenting with different molecular pathology compared to that observed for TCMR (24). Interestingly, in this study tolerance-associated transcript expression patterns in peripheral blood and in graft tissues were similar between rejection-free patients and patients with biopsy-proven borderline changes.

In this study, we used general linear mixed model for statistical analysis because it allowed us to increase the statistical power to detect differences in groups with small sample size. Low power due to low sample size did not allow us to test temporal differences among groups, and this fact may represent a limitation of the present study.

This prospective observational study, to our knowledge, is the first to validate the association and putative protective role of tolerance-associated, B-cell-related transcripts in kidney transplant patients still on standard immunosuppression. Whether this observation forms the ground for a more simplified and safer drug minimization (or elimination) strategy can only be answered following prospective biomarker-based interventional studies.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

Consecutive deceased donor kidney transplant recipients (n=75) were enrolled in this single-center study between September 2009 and November 2010. Informed written informed consent was obtained from all participants, and the study protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine (No. 608-08-10).

Sufficient mRNA was obtained from 67 patients during seven out of nine sampling time points. Patients were treated according to the center's immunosuppression treatment protocol consisting of triple maintenance therapy that comprised a calcineurin inhibitor (tacrolimus or cyclosporin A), mycophenolate mofetil, and corticosteroids with or without induction therapy based on their immunological risk. Patients with panel reactive antibodies (PRA) greater than or equal to 50% or patients with previous renal transplantation received 1 to 1.5 mg/kg/day of rATG (Thymoglobulin; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA, n=26) in two to seven doses during week 1 postsurgery. Patients with PRA 20% to 49% or those who received a kidney from an extended criteria donor were treated with 20 mg of basiliximab (Simulect; Novartis, Basel, Switzerland, n=20) on days 0 and 4. Low-risk patients (PRA <20%) received no induction therapy (n=21). Peripheral blood samples were collected at the following time points: before transplantation and on days 7, 14, 21, 28, 60, 90, and 6 and 12 months posttransplantation.

Histology and Treatment of Rejection

Kidney graft biopsies were performed based on clinical indications (case biopsies) or as defined by the protocol 90 days after transplantation. In

total, 76 case biopsies and 64 protocol biopsies were performed. Acute rejection was diagnosed according to the Banff '05 classification (25). Borderline changes and T-cell-mediated rejection (TCMR) grades I and IIA were treated by administering 1.5 to 2 g methylprednisolone, TCMR grades IIB and III and steroid-resistant TCMR were treated using rATG (10 doses; 2 mg/kg on day 1 and 1 mg/kg for 2–10 days), and antibody-mediated rejection (AMR) was treated by plasma exchange and intravenous immunoglobulin alternately over a 10-day period.

Flow Cytometry and Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Venous blood samples were collected into sterile tubes containing EDTA. Lymphocytes from peripheral blood (100 μ L; approximately 1×10^6 cells) were labeled with a four-color monoclonal antibody panel CYTO-STAT tetraChrome CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) diluted in PBS-BSA (phosphate buffered saline-bovine serum albumin) buffer for 20 min at room temperature in the dark. Red blood cells were lysed using OptiLyseC (Beckman Coulter). B cells were defined as CD45⁺CD19⁺CD3⁻.

Following staining, samples were analyzed using an FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter) with CxP and Kaluza software (Beckman Coulter). Flow cytometric analyses were performed with at least 100 gated events.

Gene Expression Analysis and RNA Isolation

Peripheral blood was drawn directly into PAXgene tubes (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol, frozen, and stored at -20°C until analyzed. Whole-blood RNA was extracted using the PAXgene Blood RNA Kit including DNase I treatment (Qiagen) using a QIA cube machine.

A small portion of renal graft tissues were stored in RNAlater (Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA) immediately after the biopsy was harvested and stored at -20°C or -80°C for further gene expression analysis. High-quality, total RNA was prepared from renal graft tissue samples using RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen), and RNA was eluted in 30 μ L of RNase-free water. The purity and concentration of the RNA were assessed using an ultraviolet-visible spectrophotometer (Nano-Drop 2000; Thermo Scientific). The RNA isolation method routinely used in our laboratory was validated and standardized on reference samples thereby eliminating errors and ensuring the same standards across all measurements. The quality of RNA samples obtained by the standard isolation protocol was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). An RNA integrity number of 8 to 10 indicated high-quality RNA suitable for further analysis. Expression patterns of operational tolerance-associated genes were then evaluated in patients for whom sufficient amounts of mRNA were isolated.

Quantitative RT-PCR Analysis

Total RNA (2 μ g) isolated from blood or tissue samples was used for complementary DNA synthesis using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA was treated with DNase and only complementary DNA samples without genomic DNA contamination were used for TaqMan assay analyses. Gene expression profiles of the eight selected tolerance-associated genes (*MS4A1*, *CD79B*, *TCL1A*, *TMEM176B*, *FOXP3*, *TOAG-1* [*C3orf23*], *MAN1A1*, and *TLR5*) were determined using quantitative real-time RT-PCR ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) using GAPDH and PGK1 as internal controls for renal biopsy tissues and HPRT and PGK1 as reference genes for whole blood samples. cDNA from one control blood sample served as the calibrator, and for biopsy samples, commercial kidney RNA was used. mRNA quantification was performed in triplicate using a predesigned TaqMan Gene Expression Assay (Hs00544818_m1 [*MS4A1*], Hs00236881_m1 [*CD79B*], Hs00951350_m1 [*TCL1A*], Hs00962650_m1 [*TMEM176B*], Hs00203958_m1 [*FOXP3*], Hs00603313_m1 [*C3orf23*], Hs00195458_m1 [*MAN1A1*], and Hs00152825_m1 [*TLR5*]; Applied Biosystems) and fast protocol (TaqMan Fast Advanced Master Mix; Applied Biosystems). RT-qPCR amplification was performed on an ABI Prism 7900 HT Sequence Detection system (Applied Biosystems). Ninety-six-well plates were analyzed as relative quantification

(RQ) and the RQ manager 1.2. software for automated data analysis was used (Applied Biosystems).

Statistical Analyses

Data are expressed as estimated marginal means \pm SEM, median (min; max), and interquartile range or absolute numbers (n) as appropriate. Characteristics of groups with acute rejection, borderline changes, or without rejection were compared using the Kruskal-Wallis test for continuous variables and by the chi-square test for categorical variables. A generalized linear mixed model for repeated measures adjusted for induction therapy was used for testing differences in peripheral blood gene expression and B-cell absolute numbers between groups. Due to non-normal distribution of data with long right tails, we used gamma regression of the dependent variable. The Kruskal-Wallis test was used for testing differences in gene expression in case biopsy specimens. Separate multivariate analyses adjusted for various factors that differed between the groups in univariate analyses were done to test for differences in gene expression profiles between groups. Calculations were done using SPSS 20 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A two-sided *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Romana Polackova, Martina Ondrakova, Katarina Barcikova, Eva Faberova, and Adela Sajdlova for their technical assistance and coordination of the sample collection as well as to the patients and nurses for their cooperation and help.

REFERENCES

- Jardine AG, Gaston RS, Fellstrom BC, et al. Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants. *Lancet* 2011; 378: 1419.
- Li XC, Turka LA. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 577.
- Mauri C, Blair PA. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 636.
- Hutchinson JA, Riquelme P, Geissler EK. Human regulatory macrophages as a cell-based medicinal product. *Curr Opin Organ Transplant* 2012; 17: 48.
- Dugast AS, Vanhove B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation. *Clin Exp Immunol* 2009; 156: 25.
- Zarkhin V, Kambham N, Li L, et al. Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney Int* 2008; 74: 664.
- Scheepstra C, Bemelman FJ, van der Loos C, et al. B cells in cluster or in a scattered pattern do not correlate with clinical outcome of renal allograft rejection. *Transplantation* 2008; 86: 772.
- Viklicky O, Hribova P, Volk HD, et al. Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 173.
- Louis S, Braudeau C, Giral M, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81: 398.
- Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1848.
- Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 1836.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 8.
- Bestard O, Cruzado JM, Rama I, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2020.
- Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, et al. Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 2576.
- Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353: 2342.
- Sawitzki B, Bushell A, Steger U, et al. Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007; 7: 1091.
- Kirk AD, Turgeon NA, Iwakoshi NN. B cells and transplantation tolerance. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6: 584.
- Heidt S, San Segundo D, Shankar S, et al. Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation* 2011; 92: 1.
- Brouard S, Mansfield E, Braud C, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15448.
- Noguchi M, Ropars V, Roumestand C, et al. Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J* 2007; 21: 2273.
- Tabrizi SJ, Niuro H, Masui M, et al. T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. *J Immunol* 2009; 182: 1490.
- Kuraishy AI, French SW, Sherman M, et al. TORC2 regulates germinal center repression of the TCL1 oncoprotein to promote B cell development and inhibit transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10175.
- Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, et al. Identification of a new member of the CD20/FcepsilonR1beta family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant* 2005; 5: 2143.
- de Freitas DG, Sellares J, Mengel M, et al. The nature of biopsies with "borderline rejection" and prospects for eliminating this category. *Am J Transplant* 2012; 12: 191.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; 7: 518.

6. DISKUZE

Pokud je nám známo, jako první jsme hodnotili a prokázali vliv různých indukčních imunosupresivních léků na počty regulačních T lymfocytů a expresi molekulárních markerů asociovaných s rejekcí či tolerancí u příjemců transplantované ledviny *in vivo*. Také jsme jako první validovali asociaci a předpokládanou protektivní roli genů asociovaných s tolerancí a s funkcí B lymfocytů u pacientů po transplantaci ledviny, kteří byli léčeni standardní imunosupresivní terapií. Dále jsme ukázali, že v časně fázi po transplantaci ledviny dochází ke změnám v periferních subpopulacích monocytů také s podílem použitých imunosupresivních režimů. Výsledky naší studie prokázaly, že pacienti léčení rATG a basiliximabem měli sníženou incidenci akutní rejekce v prvních 3 měsících po transplantaci.

V našich studiích jsme zjistili, že po indukci rATG došlo v periferní krvi pacientů po transplantaci ledviny k hluboké depleci T lymfocytů a NK buněk a k poklesu exprese genů výhradně exprimovaných těmito buňkami. Zároveň však došlo k výrazné expanzi Treg v CD4⁺ kompartmentu. Indukce rATG byla navíc krátce po transplantaci spojena s přechodnou up-regulací dvou transkriptů asociovaných s rejekcí (*MAN1A1* a *TLR5*).

Na dávce závislý depleční účinek rATG na T a NK lymfocyty byl zdokumentován v řadě studií (Hadaya *et al.*, 2010; Kho *et al.*, 2012; Sageshima *et al.*, 2011; Sewgobind *et al.*, 2009; Vacher-Coponat *et al.*, 2006), ale velmi málo je známo o změnách hladin transkriptů vlivem rATG léčby (Simon *et al.*, 2003). V naší studii jsme po indukci rATG popsali časně po transplantaci hluboký pokles genů asociovaných s tolerancí či s rejekcí (Iwase *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2001; Louis *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2003), které jsou výhradně exprimované T a NK buňkami (*CD247*, *GZMB*, *PRF1* a *FOXP3*). Hluboký pokles expresí těchto genů následovaný postupným vzestupem směrem k předtransplantačním hodnotám odpovídal depleci a repopulaci zmíněných buněčných populací.

Je zajímavé, že v časném potransplantačním období došlo k poklesu expresí genů *CD247*, *GZMB*, *PRF1* a *FOXP3*, který byl následován návratem k předtransplantačním hodnotám, také u pacientů léčených basiliximabem nebo bez indukce. Tento nálezn by mohl být vysvětlen poklesem počtů NK buněk a vlivem udržovací imunosupresivní terapie na genovou expresi. CNI inhibují transkripci prozánětlivých cytokinů, jako je IL-2 (Kapturczak *et al.*, 2004), který mimo jiné reguluje genovou expresi perforinu a granzymu (Janas *et al.*, 2005) a přímo podporuje transkripci FoxP3 (Burchill *et al.*, 2007; Murawski *et al.*, 2006). Kromě toho bylo prokázáno, že IL-2 zvyšuje expresi TCR- ζ (*CD247*) u chronického zánětu (Cheriyian *et al.*, 2011).

Zatímco u všech pacientů v časném potransplantačním období byly exprese *CD247*, *GZMB*, *PRF1* a *FOXP3* sniženy, exprese genů *MAN1A1*, *TLR5* a *TCA1M* byly zvýšeny. Tyto geny jsou exprimovány ne jenom T lymfocyty (které jsou více citlivé k použité imunosupresi), ale také monocyt/makrofágy a dendritickými buňkami (Iwasaki a Medzhitov, 2004; Jenner *et al.*, 2006; Sawitzki *et al.*, 2014; Sawitzki *et al.*, 2007; Uematsu *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2015).

Po indukci rATG jsme dále pozorovali přechodnou up-regulaci genů *MAN1A1* a *TLR5*. Studie konsorcia The Indices of Tolerance identifikovala řadu markerů, které umožnily u příjemců transplantované ledviny spolehlivě rozlišit pacienty s operační tolerancí bez potřeby imunosuprese a pacienty s chronickou rejekcí (Sagoo *et al.*, 2010). U pacientů s operační tolerancí byla exprese *TLR5* (jako jednoho z 10 odlišně exprimovaných genů) nižší a podíl *FOXP3* k α -1,2-manozidáze vyšší v porovnání s pacienty s chronickou rejekcí (Sagoo *et al.*, 2010). Pacienti, kteří prodělali chorobu štěpu proti hostiteli, měli zvýšenou expresi *TLR5* v periferní krvi a léčba přenosem Treg redukovala tuto expresi a předešla chorobě (Sawitzki *et al.*, 2014). Přestože byly rozdíly v expresi *TLR5* v naší studii statisticky signifikantní, klinická významnost tohoto nálezu je sporná. Nicméně, vyšší exprese rejekčních genů ve skupině s indukci rATG by mohl odrážet již předtransplantačně zvýšené riziko rejekce u těchto pacientů (pacienti s PRA \geq 50%).

V naší studii došlo po indukční léčbě rATG k vzestupu relativních počtů CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg *in vivo*, což naznačuje expanzi indukovanou rATG, popsanou dříve *in vitro* Lopezovou *et al.* (Lopez *et al.*, 2006) a Fengem *et al.* (Feng *et al.*, 2008) a je konzistentní s prací Gurkana *et al.* (Gurkan *et al.*, 2010), který u T lymfocytů s Treg fenotypem popsal jak periferní expanzi, tak novou migraci z thymu navozenou podáváním rATG. Studie jak *in vitro* (Feng *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2006; Sewgobind *et al.*, 2010) tak *in vivo* (Sewgobind *et al.*, 2009) prokázaly, že rATG ovlivnil počty CD4⁺CD25⁺ Treg nikoliv však jejich funkci.

U pacientů s indukční léčbou basiliximabem jsme přechodně detekovali populaci buněk CD4⁺CD25^{low}-FoxP3⁺, nepřítomnou před transplantací. Současně byly CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg prakticky nedetekovatelné či výrazně snižené oproti předtransplantačním hodnotám. Po indukční léčbě basiliximabem byla popsána snížená hustota exprese CD25 molekuly mechanismem internalizace nebo odštěpení (Vondran *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009). *In vitro* studie však ukázaly, že basiliximab může bránit detekci CD25 znaku pomocí anti-CD25 mAb využívaných v průtokové cytometrii, které se vážou na stejný epitop molekuly CD25 (Vincenti *et al.*, 1997). Šest z osmi běžně používaných klonů anti-CD25 mAb *in vitro* interferovalo s basiliximabem (Abadja *et al.*, 2010). Naše doplňující *in vivo* studie ukázala, že žádný ze třech použitých klonů se nevázal na cirkulující Treg v přítomnosti basiliximabu (Sekerikova *et al.*, 2012). Pozorování CD4⁺CD25^{low}-FoxP3⁺ populace současně s vymizením CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg bylo tedy velmi pravděpodobně zapříčiněno kompeticí basiliximabu a anti-CD25 mAb použitou pro detekci buněk průtokovou cytometrií. Vzhledem k těmto nálezům jsme dále Treg definovali jako CD4⁺FoxP3⁺. Absolutní počty CD4⁺FoxP3⁺Treg byly po indukci Basiliximabem přechodně zvýšené což je v souladu s nálezy Bluestone *et al.* (Bluestone *et al.*, 2008). Jiné práce však tento nálezu nepotvrdily (Bouvy *et al.*, 2014; de Goer de Herve *et al.*, 2010).

Léčba basiliximabem byla dále spojená se zvýšenou expresí genů *FOXP3* a *TCAIM*. *TCAIM* byl vysoce exprimován během experimentálního navození a trvání tolerance k dárcovským aloantigenům *in vivo*, což vedlo k přijetí štěpů ledviny u potkanů a srdce u myší; jeho exprese poklesla v periferní krvi a ve štěpu před tím, než došlo k rejekci štěpu (Sawitzki *et al.*, 2007). Tato down-regulace nastala v buňkách infiltrujících štěp a po T buněčné aktivaci *in vitro* (Sawitzki *et al.*, 2007). Vzestup exprese

mRNA *TCAIM* byl popsán také po podání regulačních makrofágů pacientům před transplantací ledviny od žijícího dárce (Hutchinson *et al.*, 2011). V potkaním modelu transplantace ledviny byla exprese *TCAIM* dramaticky redukována u neléčených příjemců a u příjemců po přenosu donor-specifických paměťových buněk (Siepert *et al.*, 2012). Nedávno bylo prokázáno, že *protein* TCAIM inhiboval spontánní vývoj paměťových a efektorových T lymfocytů, které jsou nezbytné pro rozvoj rejekce alogenního štěpu (Schumann *et al.*, 2014). FOXP3 je hlavní transkripční faktor Treg (Bluestone, 2011). Hladiny jeho transkriptů byly vyšší u pacientů s operační tolerancí nebo stabilní funkcí štěpu na imunopresi v porovnání s pacienty s chronickou rejekcí (Iwase *et al.*, 2011; Louis *et al.*, 2006). Vyšší exprese *FOXP3* a *TCAIM* v naší studii spolu s vyššími počty Treg po indukci basiliximabem mohou naznačovat protektivní potenciál této léčby.

Předpokládá se, že nerovnováha v poměru Treg/Teff může mít vliv na osud štěpu (Zheng *et al.*, 2003). V naší studii jsme tuto hypotézu potvrdili pouze u pacientů po indukci basiliximabem, což může být vysvětleno faktem, že všechny akutní rejekce v rATG skupině byly zprostředkované protilátkami. Naše předchozí výzkumy naznačují rozdíl v imunitní regulaci ABMR a TCMR (Viklicky *et al.*, 2010). Podobně studie metodou microarray odhalily kvantitativně specifické exprese molekul a skupiny transkriptů specifických pro patogenezi T lymfocyty a protilátkami zprostředkované rejekce transplantované ledviny (Halloran *et al.*, 2010). V naší studii jsme pozorovali trend k vyšším předtransplantačním relativním počtům Teff u pacientů bez indukce, kteří prodělali těžkou steroid-rezistentní rejekci. Navzdory malému počtu pacientů může toto pozorování podporovat nálezy jiné práce, která ukázala, že vyšší předtransplantační hodnoty Teff byly asociovány s nepříznivými výsledky (Egawa *et al.*, 2009).

Výsledky naší studie monocytárních subpopulací u pacientů po transplantaci ledviny svědčí pro to, že u těchto pacientů dochází po transplantaci k posunu v zastoupení CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů a že jsou tyto změny částečně ovlivněny použitým imunopresivním režimem. Během prvního týdne po transplantaci bylo zastoupení intermediálních/neklasických CD14⁺CD16⁺ sníženo, což by mohlo být způsobeno jejich přesunem do štěpu nebo jejich selektivní delecí. Ta se zdá být více pravděpodobná, protože je tato subpopulace stárnoucí (Merino *et al.*), což nepřímo naznačuje, že může být více citlivá k agresivnímu prostředí „cytokinové bouře“ spojené s ischemicko-reperfučním poškozením transplantované ledviny. Počáteční počty CD14⁺CD16⁺ monocytů před transplantací byly vyšší než u zdravých kontrol, což odráží konečné stádium onemocnění ledvin (Rogacev *et al.*).

Dále jsme pozorovali vliv různých léčebných imunopresivních režimů na počty monocytárních subpopulací. U pacientů bez indukce a pacientů s indukci rATG došlo k signifikantnímu poklesu počtu CD14⁺CD16⁺ monocytů během prvního týdne po transplantaci, zatímco u pacientů léčených basiliximabem došlo jen k mírnému poklesu dva týdny po transplantaci. V *in vitro* experimentu jsme prokázali přímý vliv rATG na pokles CD14⁺CD16⁺ monocytů, basiliximab tuto subpopulaci *in vitro* neovlivnil. Vysvětlení této odlišné buněčné odpovědi může spočívat v různých mechanismech působení rATG a basiliximabu. Polyklonální rATG vede k okamžité, na T lymfocyty cílené, depleci se zřejmým vlivem i na další imunitní buňky, zatímco basiliximab se váže na α -řetězec IL-2R (CD25) na povrchu

aktivovaných T lymfocytů, které pak nejsou schopny navázat IL-2. Léčba basiliximabem ovlivňuje především IL-2 a T lymfocyty zprostředkovanou imunitní odpověď a pravděpodobně nemá přímý vliv na monocyty (Vincenti, 2005).

Časné zvýšení exprese CD163 znaku může být výsledkem léčby kortikosteroidy, které jsou součástí standardních imunosupresivních režimů. Indukce exprese CD163 vlivem glukokortikoidů již byla dříve popsána (Maniecki *et al.*, 2006) a naše *in vitro* data potvrdila časnou expresi CD163 na monocyttech v odpovědi na methylprednisolon. Kromě zvýšení počtu monocytů exprimujících CD163 vedla stimulace methylprednisolonom také ke zvýšení hustoty exprese CD163 na buněčném povrchu. Opožděné navození exprese CD163 u pacientů léčených rATG bylo překvapivě spojeno s prodloužením exprese tohoto znaku a může být důsledkem regulace jinými indukovanými buňkami, protože trvalo 3 měsíce po posledním podání rATG. Počáteční počty CD14⁺CD163⁺ monocytů se nelišily od hodnot u zdravých kontrol. Současně se vzestupem počtů CD14⁺CD163⁺ subpopulace jsme pozorovali snížení celkových krevních monocytů jeden týden po transplantaci u pacientů léčených rATG. Bylo prokázáno, že rATG indukuje apoptózu monocytů (Grulich *et al.*, 2009). Dá se předpokládat vliv rATG na funkci monocytů včetně exprese povrchových markerů a produkce cytokinů.

Počet periferních CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů by se mohl stát jedním z potenciálně perspektivních ukazatelů ke zhodnocení imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny. Indukce imunosupresivních CD14⁺CD163⁺ monocytů a potlačení prozánětlivých intermediálních/neklasických CD14⁺CD16⁺ monocytů by mohla hrát protektivní úlohu v časně fázi po transplantaci ledviny.

V naší studii jsme dále s ohledem na osud štěpu během jednoročního sledování pacientů po transplantaci ledviny léčených standardní imunosupresí hodnotili počty periferních B lymfocytů a exprese genů, které byly rozdílně exprimovány v krvi pacientů s operační tolerancí. Z našich dat vyplývá důkaz o zvýšené imunoregulaci u pacientů bez rejekce v porovnání s pacienty s akutní rejekcí. Příjemci štěpu, kteří neprodělali akutní rejekci během prvního roku po transplantaci, měli trvale zvýšené exprese *FOXP3* a stejně tak poměr *FOXP3/MAN1A1* v periferní krvi. Podobně byla u těchto pacientů v průběhu sledování konstantně zvýšená exprese *TCAIM*. Zároveň byla exprese tohoto genu snížena během akutní rejekce v časném potransplantačním období snížena, což naznačuje, že by úloha tohoto makeru měla být dále klinicky validována.

Nedávno bylo ukázáno, že složení B lymfocytárního kompartmentu je určující pro osud štěpu; naivní a transitorní B lymfocyty byly asociovány s dlouhodobou funkcí štěpu a operační tolerancí, zatímco paměťové B lymfocyty s omezeným přežitím štěpu a rejekcí (Heidt *et al.*, 2011; Kirk *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010). My jsme pozorovali vyšší počty B lymfocytů u pacientů bez rejekce a s hraničními změnami v porovnání s pacienty s akutní rejekcí. Dále jsme potvrdili klinickou důležitost markerů operační tolerance spojených s funkcí B lymfocytů v průběhu jednoho roku po transplantaci u pacientů léčených standardní imunosupresí. Ve studii konsorcia Indices of Tolerance (Sagoo *et al.*, 2010) byly pomocí microarray identifikovány geny *CD79B*, *MS4A1* (*CD20*) a *TCLA1* mezi celkem 10 geny, které nejlépe odlišují pacienty s operační tolerancí od ostatních skupin pacientů. Transkripty genů *TCL1A*, *CD79B*, *MS4A1* byly zvýšeně exprimovány v krvi pacientů s operační tolerancí bez imunosupresivní léčby

v porovnání s pacienty se stabilní funkcí ledvinného štěpu (Newell *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010) či s pacienty s intersticiální fibrózou a tubulární atrofií (Brouard *et al.*, 2007). Všechny tři výše zmíněné široce citované studie (Brouard *et al.*, 2007; Newell *et al.*, 2010; Sagoo *et al.*, 2010) hodnotily pacienty s operační tolerancí s dlouhodobě fungujícími štěpy, ale analýza tolerantních markerů u pacientů v časném potransplantačním období, kdy jsou pacienti ještě léčeni vysokodávkovou imunosupresí a během akutní rejekce zatím chyběla. Naše prospektivní studie tak nabízí nový pohled na problematiku tolerance.

V naší studii jsme pozorovali vyšší exprese genů *CD79B*, *MS4A1* a *TCL1A* v periferní krvi pacientů s dobrým osudem štěpu během období sledování. Gen *CD79B*, kóduje transmembránový protein, který je součástí komplexu antigenního receptoru B lymfocytů. Nejvýraznější rozdíly v genové expresi byly u genů *MS4A1* a *TCL1A*. *MS4A1* (CD20) je transmembránový protein exprimovaný na zralých i nezralých B lymfocytech. Fyziologická exprese onkoproteinu *TCL1A* (T-cell leukemia/lymphoma 1A) je limitovaná na časná vývojová stádia buněk (včetně imunitních) a jeho exprese byla signifikantně zvýšená u naivních B lymfocytů a lymfocytů s prodlouženým přežitím (Noguchi *et al.*, 2007; Tabrizi *et al.*, 2009). Exprese tohoto proteinu byla nejvyšší u nezralých B lymfocytů a nízká nebo zcela chybějící u zralých B lymfocytů (Kuraishy *et al.*, 2007). V naší studii byly v periferní krvi několik měsíců po transplantaci up-regulovány geny asociované s naivními nezralými B lymfocyty.

Rok po publikování naší práce ukazující asociaci markerů tolerance spojených s funkcí B lymfocytů s dobrým osudem štěpu potvrdil naše závěry Heidt *et al.*, kteří vyšetřili exprese stejných markerů u nemocných s probíhající rejkci (Heidt *et al.*, 2014). Je tak možno soudit, že exprese *TCL1* a vyšší zastoupení transientních B buněk v periférii představují prognosticky příznivý fenotyp. Tito nemocní by pak nemuseli být vystaveni standardní imunosupresi, která je pro ně vlastně nadměrná.

Další z námi analyzovaných genů – *TMEM176B*, preferenčně exprimovaný na klidových makrofázích a dendritických buňkách, byl v modelu indukované tolerance po transplantaci srdce navozené krevní transfuzí zvýšeně exprimován v dlouhodobě přežívajících štěpech bez známek chronické rejekce (Louvet *et al.*, 2005). Naše pozorování ukazují zvýšenou expresi tohoto genu v krvi pacientů s akutní rejkci, což naznačuje jeho asociaci s prezentací aloantigenů a se zánětem. Tolerogenní potenciál této molekuly musí být ještě přezkoumán.

V naší studii byli pacienti s nálezem hraničních změn v biopsii zkoumání jako nezávislá kohorta. Navzdory tomu, že systém Banffské klasifikace nepokládá hraniční změny za rejkci, mnoho center léčí pacienty s hraničními změnami intravenózními kortikosteroidy. Nedávno se ukázalo, že pacienti s nálezem hraničních změn představují nehomogenní diagnostickou skupinu s odlišnou molekulární patologií v porovnání s TCMR (de Freitas *et al.*, 2012). Je zajímavé, že v naší studii byly exprese genů asociovaných s tolerancí v periferní krvi a ve štěpu podobná u pacientů bez rejekce a pacientů hraničními změnami.

Domníváme se, že nové biomarkery tolerance představují naději pro budoucí potransplantační sledování, ale jejich užitečnost musí být validována v prospektivních klinických studiích.

7. ZÁVĚRY

1. Indukční léčba rATG byla asociována s expanzí CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulačních buněk. Léčba basiliximabem vedla k přechodnému objevení se CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ buněk při současném přechodném vymizení CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Pacienti léčení indukční imunopresivní léčbou měli nižší výskyt rejekcí v porovnání s pacienty bez indukce. Trvale vyšší poměr CD4⁺FoxP3⁺ Treg k CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ Teff byl asociovaný s nepřítomností rejekce po indukci basiliximabem. Tyto nálezy naznačují možné další mechanismy podílející se na protirejčným působení rATG a basiliximabu.
2. Indukční léčba rATG byla krátce po transplantaci spojena s poklesem T a NK buněk a transkriptů asociovaných s T a NK buňkami a s up-regulací dvou transkriptů asociovaných s rejekcí (*MAN1A1* a *TLR5*). Vyšší exprese těchto dvou rejekčních genů ve skupině s rATG léčbou mohou odrážet již předtransplatačně zvýšené riziko rejekce u těchto pacientů. Indukční léčba basiliximabem byla asociována se zvýšením absolutních počtů Treg a zvýšenou hladinou exprese genů *FOXP3* a *TCAIM*, což může naznačovat protektivní potenciál léčby basiliximabem.
3. Transplantace ledviny je spojena se změnou monocytárních subpopulací CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ a je částečně ovlivněna použitým imunopresivním režimem. Počet periferních CD14⁺CD16⁺ a CD14⁺CD163⁺ monocytů by se mohl stát jedním z potenciálně perspektivních ukazatelů ke zhodnocení imunitní odpovědi u pacientů po transplantaci ledviny. Indukce imunopresivních CD14⁺CD163⁺ monocytů a potlačení prozánětlivých CD14⁺CD16⁺ monocytů by mohla hrát protektivní úlohu v časně fázi po transplantaci ledviny.
4. V průběhu sledování byly u pacientů bez rejekce a pacientů s hraničními změnami pozorovány signifikantně vyšší počty periferních B lymfocytů a exprese genů spojených s funkcí B lymfocytů (*MS4A1* (CD20), *TCL1A*, *CD79B*) a dále *TCAIM* a *FOXP3* v porovnání s pacienty s rejekcí. Ve štěpech byly nejvyšší exprese *TCAIM* pozorovány u pacientů bez rejekce. Naše pozorování naznačují, že „B buněčný podpis“ známý od pacientů po transplantaci ledviny s operační tolerancí bez nutnosti imunopresivní léčby, je také spojen s kontrolovanou aloimunitní odpovědí u pacientů po transplantaci ledviny na běžné imunopresivní léčbě.

8. CONCLUSIONS

1. The rATG induction therapy was associated with the expansion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. Basiliximab caused a transient appearance of CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ cells and concurrently a transient disappearance of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Patients treated with induction therapy had lower incidence of rejection compared to patients with no induction. Sustained high CD4⁺FoxP3⁺ Treg / CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ T_H1 ratios were associated with absence of rejection after basiliximab induction. These findings suggest possible additional mechanisms participating on anti-rejection action of rATG and basiliximab.
2. The rATG induction therapy was associated with an intense reduction in all T cell type population and NK cells and profound decreases of T and NK cell-related transcripts and with the up-regulation of two rejection-associated transcripts (*MAN1A1A* and *TLR5*) in the early post-transplant period. Higher expression of these two rejection genes could reflect higher pre-transplant risk in these patients. Basiliximab induction was associated with increased absolute number of Tregs, and increased expression of tolerance associated markers *FOXP3* and *TCAIM* which could indicate a protective potential of basiliximab.
3. Kidney transplantation is associated with modulation of CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺CD163⁺ monocyte subpopulations partially affected by an immunosuppressive regimen used. The number of peripheral CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺CD163⁺ monocytes might be one of new potentially perspective laboratory parameters to evaluate immune responses in kidney transplant recipients. The induction of immunosuppressive CD14⁺CD163⁺ monocytes and down-regulation of proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocytes might play a protective role in the early phase after kidney transplantation.
4. A significantly higher number of peripheral B cells and expressions of B-cell-related genes (*MS4A1*, *TCL1A*, *CD79B*), *TCAIM* and *FOXP3* were observed during follow-up in rejection-free patients and in patients with borderline changes as compared to rejection group. Highest intragraft expression of *TCAIM* was observed in rejection-free patients. These observations suggest that “B-cell signatures”, known from drug-free tolerant patients without any immunosuppression, are also associated with controlled alloimmune response in kidney transplant recipients on standard immunosuppression therapy.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abadja F, Alamartine E, Berthoux F, *et al.* Quantification of circulating regulatory T cells by flow cytometry in kidney transplant patients after basiliximab induction therapy. *Transplantation* 2010; 89(3):366-368.
- Alakulppi NS, Kyllonen LE, Partanen J, *et al.* Diagnosis of acute renal allograft rejection by analyzing whole blood mRNA expression of lymphocyte marker molecules. *Transplantation* 2007; 83(6):791-798.
- Altermann W, Schlaf G, Rothhoff A, *et al.* High variation of individual soluble serum CD30 levels of pre-transplantation patients: sCD30 a feasible marker for prediction of kidney allograft rejection? *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(10):2795-2799.
- Alvarez CM, Paris SC, Arango L, *et al.* Kidney transplant patients with long-term graft survival have altered expression of molecules associated with T-cell activation. *Transplantation* 2004; 78(10):1541-1547.
- Amico P. Evolution of graft survival in kidney transplantation: an analysis of the OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2010;1-15.
- Ashton-Chess J, Giral M, Brouard S, *et al.* Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation* 2007; 84(10):1215-1219.
- Augustine JJ, Poggio ED, Heeger PS, *et al.* Preferential benefit of antibody induction therapy in kidney recipients with high pretransplant frequencies of donor-reactive interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent spots. *Transplantation* 2008; 86(4):529-534.
- Baniyash M. TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(9):675-687.
- Bellisola G, Tridente G, Nacchia F, *et al.* Monitoring of cellular immunity by interferon-gamma enzyme-linked immunosorbent spot assay in kidney allograft recipients: preliminary results of a longitudinal study. *Transplant Proc* 2006; 38(4):1014-1017.
- Bestard O, Cruzado JM, Mestre M, *et al.* Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J Immunol* 2007; 179(7):4901-4909.
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; 172(4379):603-606.
- Bluestone JA. Mechanisms of tolerance. *Immunol Rev* 2011; 241(1):5-19.
- Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, *et al.* The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8(10):2086-2096.
- Bouvy AP, Klepper M, Kho MM, *et al.* The impact of induction therapy on the homeostasis and function of regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29(8):1587-1597.
- Braudeau C, Racape M, Giral M, *et al.* Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int* 2007; 20(10):845-855.
- Brouard S, Mansfield E, Braud C, *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(39):15448-15453.
- Bunnag S, Allanach K, Jhangri GS, *et al.* FOXP3 expression in human kidney transplant biopsies is associated with rejection and time post transplant but not with favorable outcomes. *Am J Transplant* 2008; 8(7):1423-1433.
- Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, *et al.* IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007; 178(1):280-290.
- Condamine T, Le Texier L, Howie D, *et al.* Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2010; 88(3):507-515.

Crespo M, Heidt S, Redondo D, *et al.* Monitoring B cell subsets and alloreactivity in kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando)* 2015; 29(2):45-52.

de Freitas DG, Sellares J, Mengel M, *et al.* The nature of biopsies with "borderline rejection" and prospects for eliminating this category. *Am J Transplant* 2012; 12(1):191-201.

de Goer de Herve MG, Gonzales E, Hendel-Chavez H, *et al.* CD25 appears non essential for human peripheral T(reg) maintenance in vivo. *PLoS One* 2010; 5(7):e11784.

Dharnidharka VR, Stablein DM, Harmon WE. Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS. *Am J Transplant* 2004; 4(3):384-389.

Egawa H, Ozawa K, Takada Y, *et al.* Impact of preexisting circulating effector T cells on the outcome of ABO-incompatible adult LDLT. *Dig Dis Sci* 2009; 54(10):2253-2263.

Elias N, Cosimi AB, Kawai T. Clinical trials for induction of renal allograft tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2015; 20(4):406-411.

Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, *et al.* Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. *Blood* 2008; 111(7):3675-3683.

Ford ML, Kirk AD, Larsen CP. Donor-reactive T-cell stimulation history and precursor frequency: barriers to tolerance induction. *Transplantation* 2009; 87(9 Suppl):S69-74.

Girmanova E, Hrubá P, Viklický O. Circulating biomarkers of tolerance. *Transplant Rev (Orlando)* 2015; 29(2):68-72.

Grulich C, Ziegler C, Finke J. Rabbit anti T-lymphocyte globulin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cell compartments and leukemia cells, while hematopoietic stem cells are apoptosis resistant. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15(2):173-182.

Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, *et al.* Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant* 2010; 10(9):2132-2141.

Hadaya K, Avila Y, Valloton L, *et al.* Natural killer cell receptor--repertoire and functions after induction therapy by polyclonal rabbit anti-thymocyte globulin in unsensitized kidney transplant recipients. *Clin Immunol* 2010; 137(2):250-260.

Halloran PF, de Freitas DG, Einecke G, *et al.* The molecular phenotype of kidney transplants. *Am J Transplant* 2010; 10(10):2215-2222.

Hasek M, Hrabá T, Benesová H, *et al.* [Immunologic considerations on embryonic parabiosis of duck and chick.]. *Ceskoslov Biol* 1955; 4(3):135-137.

Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, *et al.* Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 1999; 163(4):2267-2275.

Heidt S, San Segundo D, Shankar S, *et al.* Peripheral blood sampling for the detection of allograft rejection: biomarker identification and validation. *Transplantation* 2011; 92(1):1-9.

Heidt S, Vergunst M, Anholts JD, *et al.* B Cell Markers of Operational Tolerance Can Discriminate Acute Kidney Allograft Rejection From Stable Graft Function. *Transplantation* 2014.

Heinemann FM, Rebmann V, Witzke O, *et al.* Association of elevated pretransplant sCD30 levels with graft loss in 206 patients treated with modern immunosuppressive therapies after renal transplantation. *Transplantation* 2007; 83(6):706-711.

Hribova P, Lacha J, Kotsch K, *et al.* Intrarenal cytokine and chemokine gene expression and kidney graft outcome. *Kidney Blood Press Res* 2007; 30(5):273-282.

Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, *et al.* Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol* 2011; 187(5):2072-2078.

Cheriyán VT, Thomas C, Balaram P. Augmentation of T-cell immune responses and signal transduction proteins in oral cancer patients: potential for IL-2-mediated immunotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(10):1435-1444.

Chesneau M, Pallier A, Braza F, *et al.* Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am J Transplant* 2014; 14(1):144-155.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5(10):987-995.

Iwase H, Kobayashi T, Kodera Y, *et al.* Clinical significance of regulatory T-cell-related gene expression in peripheral blood after renal transplantation. *Transplantation* 2011; 91(2):191-198.

Janas ML, Groves P, Kienzle N, *et al.* IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol* 2005; 175(12):8003-8010.

Jenner J, Kerst G, Handgretinger R, *et al.* Increased alpha2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells. *Exp Hematol* 2006; 34(9):1212-1218.

Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 2004; 36(2 Suppl):25S-32S.

Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, *et al.* HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med* 2008; 358(4):353-361.

KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9 Suppl 3S1-155.

Keeren K, Friedrich M, Gebuhr I, *et al.* Expression of tolerance associated gene-1, a mitochondrial protein inhibiting T cell activation, can be used to predict response to immune modulating therapies. *J Immunol* 2009; 183(6):4077-4087.

Kho MM, Bouvy AP, Cadogan M, *et al.* The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol* 2012; 26(4):186-190.

Kim SH, Oh EJ, Kim MJ, *et al.* Pretransplant donor-specific interferon-gamma ELISPOT assay predicts acute rejection episodes in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2007; 39(10):3057-3060.

Kirk AD, Turgeon NA, Iwakoshi NN. B cells and transplantation tolerance. *Nat Rev Nephrol* 2010; 6(10):584-593.

Kreijveld E, Koenen HJ, van Cranenbroek B, *et al.* Immunological monitoring of renal transplant recipients to predict acute allograft rejection following the discontinuation of tacrolimus. *PLoS One* 2008; 3(7):e2711.

Kuraishy AI, French SW, Sherman M, *et al.* TORC2 regulates germinal center repression of the TCL1 oncoprotein to promote B cell development and inhibit transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(24):10175-10180.

Lesko LJ, Atkinson AJ, Jr. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:347-366.

Leventhal J, Abecassis M, Miller J, *et al.* Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Transl Med* 2012; 4(124):124ra128.

Li B, Hartono C, Ding R, *et al.* Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001; 344(13):947-954.

Lipman ML, Stevens AC, Bleackley RC, *et al.* The strong correlation of cytotoxic T lymphocyte-specific serine protease gene transcripts with renal allograft rejection. *Transplantation* 1992; 53(1):73-79.

Lipman ML, Stevens AC, Strom TB. Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 1994; 152(10):5120-5127.

Lo AS, Ma Q, Liu DL, *et al.* Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16(10):2769-2780.

Lopez M, Clarkson MR, Albin M, *et al.* A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(10):2844-2853.

Louis S, Braudeau C, Giral M, *et al.* Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; 81(3):398-407.

Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, *et al.* Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts. *American Journal of Transplantation* 2005; 5(9):2143-2153.

Malek TR, Yu A, Vincek V, *et al.* CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002; 17(2):167-178.

Maniecki MB, Moller HJ, Moestrup SK, *et al.* CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. *Immunobiology* 2006; 211(6-8):407-417.

Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, *et al.* Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest* 2008; 118(8):2845-2857.

Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, *et al.* Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7(2):309-319.

Medawar PB. The immunology of transplantation. *Harvey Lect* 1956;(Series 52):144-176.

Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, *et al.* Senescent CD14⁺CD16⁺ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J Immunol* 186(3):1809-1815.

Murawski MR, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, *et al.* Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1079:198-204.

Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005; 353(22):2342-2351.

Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant* 2006; 6(9):2006-2012.

Newell KA, Asare A, Kirk AD, *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120(6):1836-1847.

Nickel P, Lacha J, Ode-Hakim S, *et al.* Cytotoxic effector molecule gene expression in acute renal allograft rejection: correlation with clinical outcome; histopathology and function of the allograft. *Transplantation* 2001; 72(6):1158-1160.

Nickel P, Presber F, Bold G, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent spot assay for donor-reactive interferon-gamma-producing cells identifies T-cell presensitization and correlates with graft function at 6 and 12 months in renal-transplant recipients. *Transplantation* 2004; 78(11):1640-1646.

Noguchi M, Ropars V, Roumestand C, *et al.* Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J* 2007; 21(10):2273-2284.

Pavlova Y, Viklicky O, Slatinska J, *et al.* Soluble CD30 and Hepatocyte growth factor as predictive markers of antibody-mediated rejection of the kidney allograft. *Transpl Immunol* 2011; 25(1):72-76.

Pelzl S, Opelz G, Wiesel M, *et al.* Soluble CD30 as a predictor of kidney graft outcome. *Transplantation* 2002; 73(1):3-6.

Pratschke J, Weiss S, Neuhaus P, *et al.* Review of nonimmunological causes for deteriorated graft function and graft loss after transplantation. *Transpl Int* 2008; 21(6):512-522.

Reutzel-Selke A, Jurisch A, Denecke C, *et al.* Donor age intensifies the early immune response after transplantation. *Kidney Int* 2007; 71(7):629-636.

Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, *et al.* CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 32(1):84-92.

Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(4):736-746.

Rush D, Nickerson P, Gough J, *et al.* Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(11):2129-2134.

Sabek O, Dorak MT, Kotb M, *et al.* Quantitative detection of T-cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation* 2002; 74(5):701-707.

Sadlack B, Merz H, Schorle H, *et al.* Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993; 75(2):253-261.

Sageshima J, Ciancio G, Guerra G, *et al.* Prolonged lymphocyte depletion by single-dose rabbit anti-thymocyte globulin and alemtuzumab in kidney transplantation. *Transpl Immunol* 2011; 25(2-3):104-111.

Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, *et al.* Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010; 120(6):1848-1861.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3):1151-1164.

Sawitzki B, Brunstein C, Meisel C, *et al.* Prevention of graft-versus-host disease by adoptive T regulatory therapy is associated with active repression of peripheral blood Toll-like receptor 5 mRNA expression. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; 20(2):173-182.

Sawitzki B, Bushell A, Steger U, *et al.* Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance. *Am J Transplant* 2007; 7(5):1091-1102.

Sawitzki B, Pascher A, Babel N, *et al.* Can we use biomarkers and functional assays to implement personalized therapies in transplantation? *Transplantation* 2009; 87(11):1595-1601.

Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, *et al.* Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants. *Am J Transplant* 2012; 12(5):1133-1145.

Segovia M, Louvet C, Charnet P, *et al.* Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant* 2014; 14(5):1021-1031.

Sekerkova A, Brabcova E, Krystufkova E, *et al.* Basiliximab Treatment Interferes with Anti CD25 Monoclonal Antibodies Used for Flow Cytometry Detection of Tregs in Kidney Transplant Recipient. *Supplement to Transplantation* 2012; 94(10S):982-982.

Sewgobind VD, Kho MM, van der Laan LJ, *et al.* The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(5):1635-1644.

Sewgobind VD, van der Laan LJ, Kho MM, *et al.* Characterization of rabbit antithymocyte globulins-induced CD25+ regulatory T cells from cells of patients with end-stage renal disease. *Transplantation* 2010; 89(6):655-666.

Schlaf G, Altermann WW, Rothhoff A, *et al.* Soluble CD30 serum level--an adequate marker for allograft rejection of solid organs? *Histol Histopathol* 2007; 22(11):1269-1279.

Schumann J, Stanko K, Woertge S, *et al.* The mitochondrial protein TCAIM regulates activation of T cells and thereby promotes tolerance induction of allogeneic transplants. *Am J Transplant* 2014; 14(12):2723-2735.

Siepert A, Ahrlich S, Vogt K, *et al.* Permanent CNI treatment for prevention of renal allograft rejection in sensitized hosts can be replaced by regulatory T cells. *Am J Transplant* 2012; 12(9):2384-2394.

Simon T, Opelz G, Weimer R, *et al.* The effect of ATG on cytokine and cytotoxic T-lymphocyte gene expression in renal allograft recipients during the early post-transplant period. *Clin Transplant* 2003; 17(3):217-224.

Simon T, Opelz G, Wiesel M, *et al.* Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 2003; 3(9):1121-1127.

Susal C, Pelzl S, Dohler B, *et al.* Identification of highly responsive kidney transplant recipients using pretransplant soluble CD30. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(6):1650-1656.

- Susal C, Pelzl S, Opelz G. Strong human leukocyte antigen matching effect in nonsensitized kidney recipients with high pretransplant soluble CD30. *Transplantation* 2003; 76(8):1231-1232.
- Tabrizi SJ, Niuro H, Masui M, *et al.* T cell leukemia/lymphoma 1 and galectin-1 regulate survival/cell death pathways in human naive and IgM+ memory B cells through altering balances in Bcl-2 family proteins. *J Immunol* 2009; 182(3):1490-1499.
- Tait BD, Hudson F, Cantwell L, *et al.* Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology (Carlton)* 2009; 14(2):247-254.
- Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, *et al.* Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 2008; 9(7):769-776.
- Vacher-Coponat H, Brunet C, Moal V, *et al.* Tacrolimus/mycophenolate mofetil improved natural killer lymphocyte reconstitution one year after kidney transplant by reference to cyclosporine/azathioprine. *Transplantation* 2006; 82(4):558-566.
- Viklicky O, Hribova P, Brabcova I. Molecular markers of rejection and tolerance: lessons from clinical research. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(11):2701-2708.
- Viklicky O, Hribova P, Volk HD, *et al.* Molecular phenotypes of acute rejection predict kidney graft prognosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(1):173-180.
- Vincenti F. Current use and future trends in induction therapy. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2005; 16(4):506-513.
- Vincenti F, Lantz M, Birnbaum J, *et al.* A phase I trial of humanized anti-interleukin 2 receptor antibody in renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63(1):33-38.
- Vogel SZ, Schlickeiser S, Jurchott K, *et al.* TCAIM decreases T cell priming capacity of dendritic cells by inhibiting TLR-induced Ca²⁺ influx and IL-2 production. *J Immunol* 2015; 194(7):3136-3146.
- Vondran FW, Timrott K, Tross J, *et al.* Impact of Basiliximab on regulatory T-cells early after kidney transplantation: down-regulation of CD25 by receptor modulation. *Transpl Int* 2010; 23(5):514-523.
- Wang Z, Shi BY, Qian YY, *et al.* Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2009; 155(3):496-503.
- Weiss S, Kotsch K, Francuski M, *et al.* Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7(6):1584-1593.
- Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 2012; 93(1):1-10.
- Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(3):199-210.
- Zarkhin V, Chalasani G, Sarwal MM. The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplant Rev (Orlando)* 2010; 24(2):67-78.
- Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Sho M, *et al.* Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 2003; 19(4):503-514.
- Ziegler SF. FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol* 2007; 37(1):21-23.

PUBLIKACE

- 1) Kryštůfková E., Viklický O.
Biomarkery tolerance a rejekce po transplantaci ledviny.
Aktuality v nefrologii. 16, 1, 2010.
- 2) Krystufkova E, Sekerkova A, Striz I, Brabcova I, Girmanova E, Viklicky O.
Regulatory T cells in kidney transplant recipients: the effect of induction immunosuppression therapy.
Nephrology Dialysis Transplantation. 2012 Jun;27(6):2576-82. IF 3.371
- 3) Viklicky O, Krystufkova E, Brabcova I., Sekerkova A, Wohlfahrt P, Hribova P, Urbanova M, Sawitzki B, Slatinska J, Striz I, Volk HD, Reinke P.
B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients.
Transplantation. 2013 Jan 15;95(1):148-54. IF 3.535
- 4) Sekerkova A, Krepsova E, Brabcova E, Slatinska J, Viklicky O, Lanska V, Striz I.
CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation.
BMC Immunology. 2014 Feb 6;15:4. IF 2.481
- 5) Krepsova E, Tycova I, Sekerkova A, Wohlfahrt P, Hrubá P, Striz I, Sawitzki B and Viklicky O.
Effect of induction therapy on the expression of molecular markers associated with rejection and tolerance.
BMC Nephrology. 2015 Aug 19;16:146. IF 1.690

ABSTRAKTA PŘIJATÁ NA KONGRESY A SYMPOZIA

Kryštůfková E., Sekerková A., Stríž I., Brabcová I., Slatinská J., Viklický O.

Regulační T lymfocyty u nemocných s indukční imunosupresí po transplantaci ledviny.

III. Česko-slovenský transplantační kongres, Špindlerův Mlýn, Česká Republika, 16.-18.9.2010

Krystufkova E., Sekerkova A., Striz I., Brabcova I., Slatinska J., Viklicky O.

Regulatory T cells in kidney transplant recipients on induction immunosuppressive therapy.

“Bench and Bedside Nephrology” Young Investigator Forum, Germany, Dresden, 30.9.-2.10.2010

Práce byla oceněna jako “Top 10% of submitted Abstracts”

Krystufkova E., Sekerkova A., Striz I., Brabcova I., Viklicky O.

The CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD4⁺CD25^{low/-}FoxP3⁺ cells are associated with low incidence of kidney allograft rejection.

15th ESOT Congress, Glasgow, Scotland, 4.-7.10.2011

Práce byla zařazena mezi “Top 100”

Transplant International. 2011 Sep; 24(SI) s2: 80-80

Krystufkova E., Brabcová I., Lepeyova M., Hribova P., Wohlfahrt P., Wohlfahrtova M., Slatinska J., Sawitzki B., Volk H.D., Reinke P., Viklicky O.

B Cell-Related Biomarkers of Tolerance Are Up-Regulated in Rejection-Free Kidney Transplant Recipients

24th International Congress of Transplantation Society, Germany, Berlin, 15.-19.7.2012

Krystufkova E., Brabcova I., Sekerkova A., Wohlfahrt P., Hribova P., Wohlfahrtova M., Sawitzki B., Slatinská J., Striz I., Volk H.D., Reinke P., Viklicky O.

Tolerance markers in kidney transplantation: prospective study

4. Československý transplantační kongres, Slovenská Republika, Donovaly, 13.-15.9.2012

Krystufkova E., Brabcova I., Sekerkova A., Wohlfahrt P., Hribova P., Wohlfahrtova M., Sawitzki B., Slatinská J., Striz I., Volk H.D., Reinke P., Viklicky O.

Tolerance markers in kidney transplantation: prospective study

XVIII. Trilateral Czech-German-Polish Symposium on Nephrology and Young Investigator Forum, Česká Republika, Praha, 5.-6.10.2012

Krystufkova E., Brabcova I., Wohlfahrt P., Hribova P., Sekerkova A., Striz I. and Viklicky O.

The effect of induction therapy on molecular markers of rejection and tolerance in kidney transplantation.

IMMUNO 2013, Spain, Barcelona, 11.-12.3.2013

Krystufkova E., Brabcova I., Wohlfahrt P., Hribova P., Sekerkova A., Striz I. and Viklicky O.

Induction therapy and molecular markers of rejection/tolerance in kidney transplantation

The International Transplant Congress, ESOT 2013, Austria, Vienna, 8.-11.9.2013

Transplant International. 2013 Nov; 26(SI) s2: 20-20

Krepsova E., Brabcova I., Wohlfahrt P., Hribova P., Sekerkova A., Striz I., Viklicky O.

The effect of induction therapy on molecular markers of rejection and tolerance in kidney transplantation.

XIX. Trilateral Czech-German-Polish Meeting & Young Investigator Forum, Germany, Dresden, 27.-28.9.2013

Striz I., Sekerkova A., Brabcova E., Krystufkova E., Jaresova M., Viklicky O.

CD163+CD14+monocytes in kidney transplant recipients

31st Congress of the European-Academy-of-Allergy-and-Clinical-Immunology (EAACI), Switzerland, Geneva, 16.-20.6.2012

Allergy 2012 Nov; 67(SI) s96: 280-281

Sekerkova A., Brabcova E., Krystufkova E., Viklicky O., Striz I.

Basiliximab treatment interferes with anti CD25 monoclonal antibodies used for flow cytometry detection of Tregs in kidney transplant recipient

24th International Congress of Transplantation Society, Germany, Berlin, 15.-19.7.2012

Striz I., Sekerkova A., Krystufkova E., Brabcova E., Slatinska J., Viklicky O.

CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocytes in kidney allograft transplantation

24th International Congress of Transplantation Society, Germany, Berlin, 15.-19.7.2012

Pagacova L., Hoskova L., Kubanek M., Dorazilova Z., Malek I., Slavcev A., Slatinska J., Viklicky O., Parikova A., Krystufkova E.

Immunoabsorption onto staphylococcal protein A has a use for transplantology

23rd Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, The Netherlands, Amsterdam, 2.-5.6.2013

Vox sanguinis. 2013 Jun; 105(SI) s1: 257-258

Pagacova L., Hoskova L., Kubanek M., Dorazilova Z., Malek I., Slavcev A., Slatinska J., Viklicky O., Parikova A., Krystufkova E.

Our experience with protein A immunoabsorption in transplant medicine

The International Transplant Congress, ESOT 2013, Austria, Vienna, 8.-11.9.2013

Transplant International. 2013 Nov; 26(SI) s2:79-79

Hruba P., Brabcova I., Krepsova E., Slatinska J., Sekerkova A., Striz I., Zachoval R., Viklicky O.
Steroid Free Immunosuppression Is Associated With Enhanced Th1 Transcripts.
51st Congress of the European-Renal-Association (ERA) / European-Dialysis-and-Transplant-Association (EDTA), Netherlands, Amsterdam, 31.5.-3.6.2014
Nephrology Dialysis Transplantation. 2014 May. 29 s3:529-530

Hruba P., Brabcova I., Krepsova E., Slatinska J., Sekerkova A., Striz I., Zachoval R., Viklicky O.
Tolerance and Rejection Associated Transcripts in Low-Risk Kidney Transplant Recipients: Prospective Study
51st Congress of the European-Renal-Association (ERA) / European-Dialysis-and-Transplant-Association (EDTA), Netherlands, Amsterdam, 31.5.-3.6.2014
Nephrology Dialysis Transplantation. 2014 May; 29 s3:530-531

Hruba P., Brabcova I., Krepsova E., Sekerkova A., Slatinska J., Striz I., Viklicky O.
Steroid Free Immunosuppression Is Associated With Enhanced Th1 Transcripts.
World Transplant Congress, USA, California, San Francisco, 26.-31.7.2014
American Journal of Transplantation. 2014 Jun. 14 s3:894-894
Transplantation, 2014 Jul 15; 98 s1:894-894

Hruba P., Brabcova I., Krepsova E., Slatinska J., Striz I., Sekerkova A., Viklicky O.
Tolerance and Rejection Associated Transcripts in Low-Risk Kidney Transplant Recipients: Prospective Study
World Transplant Congress, USA, California, San Francisco, 26.-31.7.2014
American Journal of Transplantation. 2014 Jun; 14 s3:226-227
Transplantation, 2014 Jul 15; 98 s1:226-227

Striz I., Sekerkova A., Krystufkova E., Brabcova E., Slatinska J., Viklicky O.
Induction Therapy Modulates the Proportions of CD14+CD16+and CD14+CD163+ Monocytes in Kidney Allograft Recipients.
World Transplant Congress, USA, California, San Francisco, 26.-31.7.2014
American Journal of Transplantation. 2014 Jun; 14 s3:581-581
Transplantation, 2014 Jul 15; 98 s1:581-581