

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Zuzana Sekerková

Role BAFF cytokinu v transplantačních reakcích

The Role of BAFF cytokine in Transplantation Reactions

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Konzultant: Mgr. Markéta Rodová

Praha, 2016

Prohlášení

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

V Praze, 15. 8. 2016

Poděkování

Děkuji svému školiteli, doc. MUDr. Antoniji Slavčevovi, CSc., za odborné vedení při psaní diplomové práce a věnovaný čas. Velké poděkování také patří mé konzultantce Mgr. Markétě Rodové za velkou podporu a asistenci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji Mgr. Veronice Švachové za cenné rady a zasvěcení do průtokové cytometrie a zároveň děkuji laboratoři protokové cytometrie za odborné vedení. Také děkuji mé rodině a blízkým, kteří mě podporovali celé mé studium.

Abstrakt

Současná imunogenetická vyšetření před transplantací zahrnují kromě HLA typizace také detekci HLA-specifických protilátek, avšak ta neposkytuje informaci o B buňkách, které se účastní humorální odpovědi proti transplantovanému orgánu. BAFF (B aktivační faktor) hraje důležitou roli při proliferaci, maturaci a diferenciaci B buněk. Sestřížením membránové formy BAFF vzniká solubilní forma cytokinu, která se váže na tři typy receptorů – TACI, BAFF-R a BCMA. Některé recentní studie naznačují, že BAFF by mohl sloužit jako prediktor nebo marker protilátkami zprostředkované rejekce (AMR) u pacientů po transplantaci ledviny.

Naše studie se skládá ze dvou částí. V první části jsme se zabývali solubilním BAFF v séru pacientů po transplantaci ledviny. Cílem naší retrospektivní studie bylo proto korelovat hladiny BAFF cytokinu u pacientů před a po transplantaci s klinickým průběhem a incidencí rejekce po transplantaci. Do studie bylo zařazeno 92 příjemců ledviny. Protilátkami-zprostředkovaná (humorální) rejekce byla diagnostikována na základě pozitivního nálezu C4d depozitů v peritubulárních kapilárách (imunoflorescenční detekce) a přítomnosti donor-specifických protilátek. Hladiny BAFF byly stanoveny za využití Xmap metodiky na přístroji Luminex před transplantací, 3 měsíce, 6 měsíců a rok po transplantaci.

V druhé části diplomové práce jsme srovnávali BAFF membránově vázaný na jednotlivých subpopulací B lymfocytů (transientní, naivní, neswitchované, switchované a plazmatické) u pacientů s akutní humorální rejekcí a bez rejekce. BAFF vázaný na B lymfocytech byl měřen na průtokovém cytometru Cyan ADP 9C.

Naše výsledky naznačují, že BAFF se v době akutní humorální rejekce váže na receptory na B lymfocytech (nejvíce na plazmatických buňkách) a dochází k jeho poklesu v sérech pacientů. Pacienti, u kterých byla diagnostikována protilátkami-zprostředkovaná rejekce, měli signifikantně nižší hladiny solubilního BAFF cytokinu než pacienti bez rejekce. Podle našich výsledků by snížené koncentrace BAFF mohly sloužit jako marker humorální rejekce.

Klíčová slova: BAFF, transplantace ledvin, rejekce, Luminex, FACS

Abstract

Current immunogenetic tests before organ transplantation include HLA typing and detection of HLA-specific antibodies. However, these tests do not provide information about the B cells participating in the humoral response against the transplanted organ. BAFF (B activating factor) plays an important role in the proliferation, maturation and differentiation of B cells. A soluble form of the cytokine arises after splicing the membrane form of BAFF. The soluble cytokine binds to three types of receptors - TACI, BCMA and BCMA. Some recent studies suggest that BAFF could serve as a marker or predictor of antibody-mediated (humoral) rejection in kidney transplant recipients.

Our study consists of two parts. The first part is focused on the detection of soluble BAFF levels in patients after renal transplantation. The aim of our study was therefore to correlate levels of soluble BAFF cytokine in patients before and after transplantation with the clinical course and incidence of rejection after transplantation. The study included 92 kidney recipients. Humoral rejection was diagnosed on the basis of a positive finding of C4d deposits in peritubular capillaries (imunoflorescenční detection), and the presence of donor-specific antibodies. BAFF levels were determined using Xmap methodology by the Luminex method before transplantation, 3 months, 6 months and one year after transplantation.

In the second part, we compared the membrane-bound BAFF on subpopulations of B cells (transient, naive, nonswitched, switched, and plasmablasts) in patients with acute antibody-mediated rejection and no rejection. BAFF bound to B cells was measured on flow cytometer Cyan ADP 9C.

Our results indicate that BAFF at the time of acute humoral rejection binds to receptors on B cells (mostly on plasma cells), and its levels in the sera of patients are reduced. Patients who were diagnosed with antibody-mediated rejection had significantly lower levels of the soluble BAFF cytokine than patients without rejection. According to our results, decreased concentrations of the BAFF cytokine could serve as a marker of humoral rejection.

Keywords: BAFF, kidney transplant rejection, Luminex, FACS

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Přehled literatury	12
2.1	HLA (MHC) komplex a jeho funkce.....	12
2.1.1	HLA antigeny I. třídy	13
2.1.2	HLA antigeny II. třídy.....	13
2.1.3	Rozpoznávání HLA molekul.....	14
2.2	Rejekce	16
2.2.1	Akutní celulární rejekce	17
2.2.2	Rejekce zprostředkovaná protilátkami	17
2.2.3	Chronická rejekce.....	19
2.2.4	B lymfocyty a jejich úloha v akutní humorální rejekci.....	19
2.3	B lymfocyty	20
2.3.1	Vývoj B lymfocytů.....	20
2.3.2	Klasické folikulární B lymfocyty.....	21
2.3.3	Naivní B lymfocyty	21
2.3.4	Plazmatické buňky	22
2.3.5	Paměťové B lymfocyty	22
2.3.6	Sledované znaky na B lymfocytech	23
2.4	Úloha BAFF v buněčné biologii B LYMFOCYTŮ	24
2.4.1	BAFF a APRIL	24
2.4.2	Exprese receptorů na B lymfocytech	27
2.4.3	Exprese receptorů na T lymfocytech.....	28
2.4.4	Role BAFF-APRIL systému v životě B lymfocytů zdravého jedince	28
2.4.5	Role BAFF-APRIL systému v životě B lymfocytů nemocného jedince ...	29
2.4.6	BAFF v transplantacích.....	33
3	Cíle diplomové práce	35
4	Experimentální část.....	36

4.1	Experiment 1 – solubilní BAFF	36
4.2	Experiment 2 – membránově vázaný BAFF	37
5	Použité přístroje a chemikálie	38
5.1	Přístroje, materiál	38
5.2	Chemikálie.....	38
6	Metody	40
6.1	Měření solubilního BAFF.....	40
6.2	Izolace mononukleárních buněk z periferní krve	42
6.3	Průtoková cytometrie.....	43
6.3.1	Gatovací strategie pro stanovení lidských periferních B lymfocytů	45
6.4	Statistické zpracování dat	47
7	Výsledky	48
7.1	Stabilita solubilního cytokinu BAFF	48
7.2	Experiment 1 – solubilní BAFF (sBAFF)	49
7.2.1	Demografické údaje a klinická data příjemců ledviny a výskyt akutní humorální rejekce	49
7.2.2	Vybrané rizikové faktory ve vztahu k akutní humorální rejekci.....	50
7.2.3	Demografické údaje a klinická data příjemců ledviny a výskyt souběžné celulární a protilátkami-zprostředkované rejekce.....	51
7.2.4	Vybrané rizikové faktory ve vztahu k současně probíhající ACR a AMR.....	52
7.2.5	Demografické údaje a výskyt ACR.....	53
7.2.6	Vybrané rizikové faktory ve vztahu k výskytu ACR	54
7.2.7	Koncentrace sBAFF ve vztahu k AMR	54
7.2.8	Koncentrace sBAFF ve vztahu k současně probíhající ACR a AMR.....	56
7.2.9	Koncentrace sBAFF ve vztahu k ACR	57
7.3	Experiment 2 – membránově vázaný BAFF	57

7.3.1	Porovnání membránově vázaného BAFF u pacientů s AMR a bez rejekce na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů	61
8	Diskuze.....	63
9	Závěry	66
10	Seznam použité literatury.....	67

Seznam zkratek

ACR	Akutní celulární rejekce (buněčná)
ADCC	Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
ADP	Advanced Digital Processing
AMR	Akutní humorální rejekce (protilátkami zprostředkovaná)
APC	Antigen prezentující buňka
APRIL	A proliferation inducing ligand
ATG	Antithymocytární globulin
ATN	Akutní tubulární nekróza
BAFF (BR3)	B buněčný aktivační faktor
BAFF-R	Receptor pro B buněčný aktivační faktor
Bcl-2	Anti-apoptický protein
BCMA	B-cell maturation antigen
BCR	B buněčný receptor
BMZ	B lymfocyt marginální zóny
CD	Diferenciační antigen
CDC	Komplement-dependentní cytotoxický test
cFLIP	Cellular FADD-like IL-1 β -converting enzyme
CNI	Kalcineurinové inhibitory
CRDs	Cystein-bohaté domény
CVID	Běžná variabilní imunodeficiencie
DC	Dendritické buňky
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSA	Donor specifické protilátky
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
Fas	Povrchová molekula
FasL	Ligand Fas
Fc	Konstantní doména lehkých řetězců imunoglobulinu
FCXM	Crossmatch test za využití prtokové cytometrie
FITC	Fluorescein thioisokyanát
FS	Forward scatter
HLA	Lidský leukocytární antigen
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulin
IKEM	Institut Klinické a Experimentální Medicíny
IL	Interleukin
IVIG	Intravenózní imunoglobulin
JNK	Janus kinázy
KO	Krome orange
LPS	Lipopolysacharid
MAC	Komplementový komplex atakující membránu
MHC	Lidský leukocytární antigen
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
MPA	Kyselina mykofenolová
mTOR	Proteinkináza (serin/threonin)
NFκB	Nukleární faktor kappa B
NK	Natural killer
PAMP	Patogen asociované molekulární vzory

PB	Pacific Blue
PBS	Fosfátový pufr
PCR-SSOP	Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami
PCR-SSP	Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery
PE	Fykoerytrin
PLB	Plasmatické B lymfocyty
PRA	Panel reaktivní protilátky
RAG	Recombination-activating genes
sBAFF	Solubilní BAFF
SLE	Systémový lupus erythematoses
SS	Side scatter
TACI	Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
T_c	Cytotoxický T lymfocyt
TCR	T buněčný receptor
TGF	Transforming growth factor
T_h	Pomocný T lymfocyt
TLR	Toll-like receptors
T_x	Transplantace
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
xMAP	x-multianalyte profiling
X-Med	Střední intenzita

1 Úvod

Mezi nejzávažnější imunologické komplikace při transplantaci ledvin patří rozvoj celulární (buněčné) a humorální (protilátkami zprostředkované) rejekce, které jsou příčinou dysfunkce štěpu a vedou až k odmítnutí transplantovaného orgánu. Do nedávné doby byla pozornost věnována převážně T lymfocytům, avšak v současné době se zájem přesouvá od T lymfocytům k B lymfocytům a jejich úloze v humorální odpovědi organismu proti transplantovanému orgánu.

I přes senzitivní diagnostické testy, které zahrnují kromě HLA typizace i detekci protilátek namířených proti HLA a non-HLA antigenům dárce, je včasná diagnostika a předpověď protilátkami zprostředkované rejekce velmi obtížná. Je určena bioptickým nálezem C4d depozitů v peritubulárních kapilárách transplantovaného štěpu a zjištěním aloprotilátek v séru pacientů. Tyto testy ovšem neposkytují informaci o samotných B lymfocytech, proto se hledají nové markery, které by mohly přispět k časnému rozpoznání rizika vznikající humorální rejekce.

Současné studie naznačují, že jedním z těchto markerů by mohl být i cytokin BAFF (B buněčný aktivační faktor), který hraje důležitou roli při přežití a maturaci B lymfocytů (Banham et al., 2013, Xu et al., 2009, Thibault-Espitia et al., 2012, Snanoudj et al., 2014). Pomáhá v maturaci naivním B lymfocytům, přispívá k aktivaci buněk marginální zóny prostřednictvím Toll like receptorů, kontroluje protilátkovou odpověď a podporuje přežití plazmatických buněk a účastní se dalších imunologických reakcí. Zvýšená koncentrace BAFF je spojována s reakcí štěpu proti hostiteli, rozvojem dysfunkce štěpu ledviny (Xu et al., 2009) a při tvorbě donor-specifických protilátek. I přes tyto poznatky víme jen málo, jakou úlohu hraje solubilní BAFF a jeho receptory při transplantaci a rozvoji akutní humorální rejekce.

BAFF je popisován jako ligand vázaný na membránu nebo se vyskytuje v solubilní formě v cirkulaci (Moore et al., 1999, Schneider et al., 1999). Solubilní forma cytokinu se váže na tři typy receptorů – TACI, BAFF-R a BCMA vyskytujících se hlavně na B lymfocytech ale v menší míře i na T lymfocytech. V naší studii se zabýváme solubilní i vázanou formou cytokinu.

V první části práce jsme retrospektivně měřili hladiny solubilního BAFF v séru pacientů před a po transplantaci a výsledky srovnávali s klinickým průběhem a incidencí rejekce po transplantaci. V druhé části práce jsme měřili expresi vázaného BAFF cytokinu

na jednotlivých subpopulacích B lymocytů v periferní krvi pacientů před i po transplantaci. Snažili jsme se přispět k objasnění otázky, zda lze použít BAFF jako marker humorální rejekce u pacientů po transplantaci ledvin.

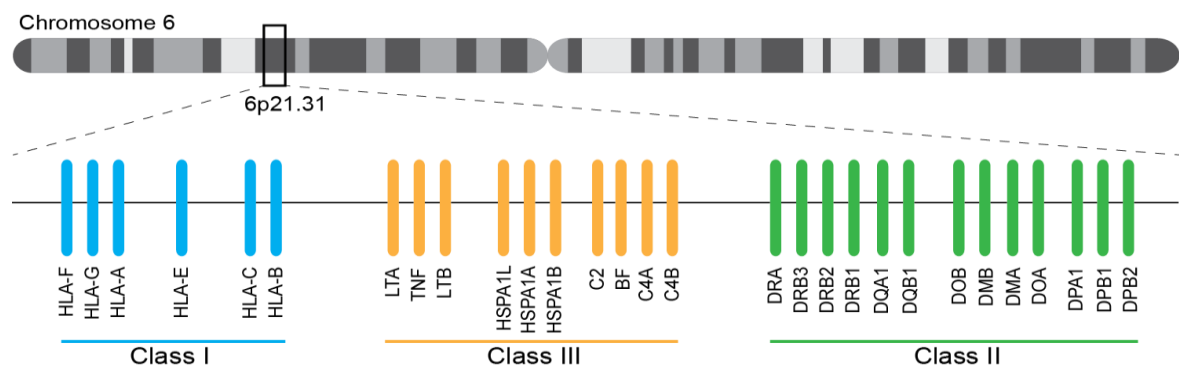
2 Přehled literatury

2.1 HLA (MHC) komplex a jeho funkce

HLA (Human Leucocyte Antigen), neboli hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex) u člověka je systém genů, který je lokalizován spolu s dalšími geny kódujícími jiné molekuly, které nesouvisí s HLA, na krátkém raménku 6. chromozomu. Hlavní funkcí HLA antigenů je předkládání peptidů pocházejících z intracelulárních nebo extracelulárních antigenů buňkám imunitního systému. Prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce. Pomocí těchto molekul buňky imunitního systému vzájemně kooperují.

Při transplantacích HLA antigeny jsou hlavními molekulami, které imunitní systém rozpoznává jako cizí, to znamená, že jsou důvodem odhojení tkáně při inkompatibilních transplantacích. Čím víc povrchových molekul se mezi dárcem a příjemcem liší, tím větší je pravděpodobnost vývoje akutní celulární a protilátkami-zprostředkované rejekce po transplantaci (Opelz et al., 1999). Pokud imunokompetentní buňky příjemce po transplantaci rozpoznávají na membráně buněk cizorodé antigeny, dochází ke spuštění imunitní reakce a k odmítnutí štěpu (rejekci).

HLA komplex obsahuje více než 200 genů a jak bylo již uvedeno, tento komplex je umístěn na krátkém raménku 6. chromozomu. Skládá se ze tří regionů (viz Obr. 1). První dvě oblasti (HLA I. třídy a HLA II. třídy) kódují HLA antigeny. Třetí oblast obsahuje geny kódující některé složky komplementu (C2, C4, Bf), TNF (tumor nekrotizující faktor), proteiny teplotního šoku a další. (Choo, 2007).



Obr. 1: Genová lokalizace HLA komplexu na chromozomu 6 (Převzato z <http://www.sciscogenetics.com/technology/humanleukocyte-antigen-complex/>).

2.1.1 HLA antigeny I. třídy

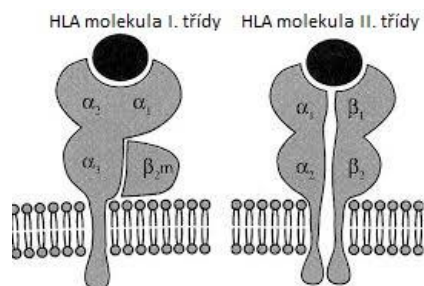
HLA antigeny I. a II. třídy jsou glykoproteiny patřící do imunoglobulinové superrodiny. HLA antigeny I. třídy se skládají z transmembránového α řetězce (mol. hmotnost 45 kDa) a nekovalentně asociovaného β 2-mikroglobulinu (mol. hmotnost 12 kDa). Řetězec α má tři domény: α_2 , α_3 tvoří vazebné místo pro peptidy a α_1 , který spolu s β 2-mikroglobulinem formuje konstantní část molekuly.

HLA antigeny I. třídy jsou exprimovány na povrchu všech somatických buněk organismu (chybí na erytrocytech), ale jejich exprese se výrazně liší u jednotlivých buněčných typů. Lymfocyty a dendritické buňky mají vysokou expresi, zatímco svalová, nebo mozková tkáň mají expresi nízkou. Jejich funkcí je předkládání poškozených nebo nefunkčních peptidů označených ubikvitinem, které pocházejí z endogenních vnitřních zdrojů nebo virových proteinů, buňkám imunitního systému. Do této kategorie jsou řazeny klasické transplantační antigeny HLA – A, B, C, které jsou vysoce polymorfní a neklasické antigeny HLA- E, F, G, jejichž exprese je omezena pouze na některé buněčné typy.

2.1.2 HLA antigeny II. třídy

HLA antigeny II. třídy jsou exprimovány na buňkách prezentujících antigen (dendritické buňky, makrofágy, monocyty, B buňky, epiteliální buňky v thymu atd.). Slouží k prezentaci peptidových fragmentů, které pocházejí z exogenních antigenů. HLA antigeny II. třídy se jsou kódovány v lokusech DR, DQ a DP.

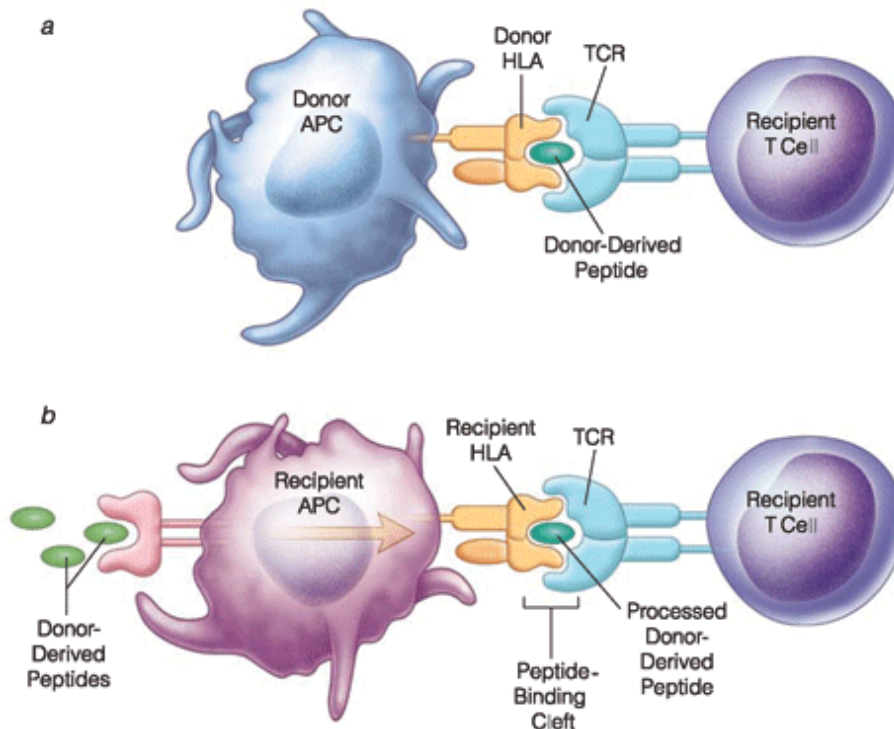
Antigeny HLA II. třídy jsou heterodiméry tvořeny dvěma řetězci označovanými jako α a β . Oba řetězce se skládají do dvou extracelulárních domén označovaných jako α_1 a α_2 a β_1 a β_2 . Řetězce jsou nekovalentně vázány interakcí druhých externích domén. Extracelulární domény α_1 a β_1 tvoří vazebné místo pro peptidy. U molekul II. třídy je vazebné místo otevřené a může vázat delší peptidy (až 15-18 AA) ve srovnání s vazebním místem I. třídy, které je uzavřené a váže kratší peptidy (8-10 AA). (Hořejší et. al., 2013)



Obr. 2: Schematické znázornění struktury HLA molekul I. a II. Třídy (Hořejší et. al., 2013)

2.1.3 Rozpoznávání HLA molekul

Klíčovou roli při rozpoznávání cizích HLA molekul štěpu mají T lymfocyty příjemce. Rozpoznávání se děje za přispění antigen prezentujících buněk (zejména dendritických buněk). Rozpoznávání antigenu probíhá dvěma základními způsoby – jako přímé a nepřímé.



Obr. 3: a) přímé rozpoznávání antigenu b) nepřímé rozpoznávání antigenu (Převzato z oddílu 10/kapitola 12 Transplantační imunologie: Základy imunologie a klinické praxe).

Přímé rozpoznávání antigenu

Přímé rozpoznávání antigenu je specifický způsob, který probíhá pouze u transplantací. T lymfocyty příjemce rozpoznávají přes svůj buněčný receptor (TCR) HLA molekuly, které jsou vystavovány na antigen-prezentujících buňkách dárce (passenger leukocytes). HLA molekuly I. třídy jsou rozpoznávány pomocí TCR cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů. Pomocné CD4⁺ T lymfocyty váží peptid v komplexu s HLA molekulami II. třídy. Tento typ rozpoznávání má většinou úlohu v časných akutních rejekcích. (Klein & Sato, 2000). Byly objasněny mechanismy, jak vznikají alloreaktivní paměťové T lymfocyty v nesenzibilizovaných jedincích. Bylo prokázáno, že alloreaktivní T lymfocyty vznikají velmi často z virových specifických paměťových T lymfocytů, a to daleko častěji než se předpokládalo (až v 45%) (L D'Orsogna et al., 2010).

Nepřímé rozpoznávání antigenu

Nepřímé rozpoznání HLA antigenů dárce se svou podstatou shoduje s rozpoznáním jiných extracelulárních proteinů. Při nepřímém rozpoznávání jsou HLA antigeny dárce pohlceny a zpracovány dendritickou buňkou nebo jinou antigen prezentující buňkou příjemce, které cestují do štěpu. Poté antigen prezentující buňky vycestují ze štěpu do sekundárních lymfatických orgánů a sleziny. Zde dochází k zpracování (processingu) a prezentaci zpracovaných fragmentů HLA molekul dárce. Krátké opracované fragmenty neshodných HLA antigenů dárce jsou prezentovány ve vazebném místě HLA antigenu II. třídy příjemce. Komplex fragmentu vázaného ve vazebném místě HLA příjemce je prezentován CD4+ T lymfocytům. Může dojít také k aktivaci CD8+ T lymfocytů, pokud byl fragment prezentován s molekulou HLA I. třídy. Tento fenomén se nazývá křížová prezentace. Nepřímé rozpoznávání antigenu dominuje při chronickém odhojování štěpu (chronická rejekce) (Viklický et al., 2008).

Nedávno byl popsán třetí způsob rozpoznávání antigenů tzv. **polopřímé** (semi-direct) rozpoznávání antigenu. Antigen prezentující buňky získávají velké množství intaktních funkčních HLA molekul dárce přímým buněčným kontaktem s dárcovskými dendritickými nebo endotelovými buňkami štěpu. Jsou prezentovány CD4+ i CD8+ T lymfocytům příjemce. (Herrera et al., 2004).

Podstatou popsaných typů imunitního rozpoznávání je interakce T buněčného receptoru (TCR) na povrchu naivních aloreaktivních T lymfocytů s MHC molekulou nacházející se na dendritické buňce, které obsahuje ve svém vazebném žlábků imunogenní peptid. Avšak tato interakce nestačí k aktivaci T lymfocytu. Jedná se pouze o první signál k zahájení imunitní reakce. K tomu, aby byla imunitní odpověď opravdu zahájena, jsou vyžadovány další kostimulační signály (interakce CD28/CD80, CD28/CD86, anebo CD40/CD154) (Game & Lechler, 2002). Tyto signály jsou získávány od antigen prezentujících buněk nebo B lymfocytů. Bez jejich spolupráce nedojde k aktivaci T lymfocytu, ale naopak ke spuštění drah vedoucí k apoptóze.

Imunitní systém příjemce může být aktivován i jinými antigeny než jen HLA antigeny. Jedná se o tzv. non-HLA antigeny (viz. Tabulka 1).

	Buňky/ tkáňová distribuce
Lidské leukocytární antigeny (HLA)	I. třída (všechny nukleární buňky)
	II. třída (APC, aktivované T lymfocyty, atd.)
Non-HLA antigeny	AB0 antigeny (erytrocyty, endoteliální buňky)
	MICA, MICB (endoteliální buňky, keratinocyty, fibroblasty, monocyty, atd.)
	Vimentin (cytoskelet), K- α 1 tubulin (plíce)
	Angiotensin II Type 1 (AT ₁) receptor (cévy, mozek, srdce, ledviny, atd.)
	Tkáňově-specifické antigeny (ledviny, srdce, játra atd.)

Tabulka 1: Antigeny hrající roli v transplantačních reakcích (Slavčev, 2013)

2.2 Rejekce

Hlavní úlohou HLA antigenů je prezentovat peptidy vlastního nebo cizího původu imunokompetentním buňkám. Rozpoznání HLA antigenů dárce či HLA antigenů příjemce s navázaným peptidem dárce vede k aktivaci mnoha efektorových mechanismů, které v důsledku vedou k odhojování (rejekci) štěpu. Imunitní reakce proti štěpu se účastní složky specifické (adaptivní) ale i nespecifické (vrozené) imunity.

Rejekce můžeme rozdělit podle efektorových mechanismů na rejekci celulární (buněčnou) a humorální (zprostředkovanou protilátkami). Mohou probíhat oba typy rejekce najednou. Také dělíme rejekce na základě doby uplynulé od transplantace na hyperakutní, akutní a chronickou. Na vzniku rejekce se kromě imunologických mechanismů podílí i neimunologické faktory jako opožděný rozvoj funkce štěpu (ATN), orgán od zemřelého dárce, porody, rasa a pohlaví příjemce a dárce (Viklický et al., 2008).

2.2.1 Akutní celulární rejekce

K akutní celulární (buněčné) rejekci dochází zejména během dnů až týdnů po transplantaci. Je zprostředkována T lymfocyty (CD4+ i CD8+) aktivovanými HLA antigeny dárce. Zapojené jsou zde i složky vrozené imunity (dendritické buňky, makrofágy).

Primárně dochází k aktivaci T lymfocytů (CD4+) příjemce a to přímým rozpoznáváním HLA molekul I. třídy dárce na povrchu štěpu. Dochází k produkci interleukinu-2 (IL-2) a následně jsou aktivovány alospecifické cytotoxické T lymfocyty (CD8+), které se vrací do lymfatické tkáně příjemce. Po návratu mají přímý cytotoxický vliv na endotel štěpu. Mezi cytotoxické mechanismy patří degranulace cytoplazmatických cytotoxických granul obsahujících perforiny a granzimy, interakce FAS-FAS ligand a sekrece lymfotoxinu. Cytotoxické působení CD8+ T_c lymfocytů vede k navození apoptózy buněk štěpu. Antigeny II. třídy musí být nejdříve indukovány pomocí protizánětlivých cytokinů (IL-4, 5) nebo IFN γ . (Kieslichová et al., 2015)

Avšak při celulární rejekci štěpu se uplatňují i mechanismy pozdní přecitlivělosti (makrofágy). Celulární infiltráty mononukleárních buněk v biopsiích ledvinného štěpu jsou známkou probíhající akutní celulární rejekce ve štěpu. (Rossmann et al., 2002)

2.2.2 Rejekce zprostředkováná protilátkami

Hyperakutní rejekce

Jedná se o podtyp akutní protilátkami zprostředkované (AMR) rejekce. Jde o nejčasnější typ rejekce, dochází k němu během několika minut až hodin po transplantaci. Tato reakce je vyvolaná preformovanými protilátkami proti neshodným HLA antigenům dárce v séru příjemce, které vznikají jako důsledek předešlé transplantace, krevní transfúze či těhotenství. Takto vzniklé protilátky, obzvláště izotypu IgG, se váží na endotel štěpu. Po navázání protilátky aktivují komplement. Dochází ke štěpné kaskádě komplementu, tvorbě lytického komplexu a přímého cytotoxického účinku na cévní endotel štěpu. Současně jsou syntetizovány prozánětlivé cytokiny. Dochází k vazokonstrikci, otoku, ucpání cév tromby a v důsledku toho k zablokování krevního zásobení štěpu a k jeho nekróze. V současné době se tento typ rejekce vyskytuje jen vzácně, protože se před každou transplantací provádí komplement-dependentní cytotoxický crossmatch (CDC) test. Jeho

pozitivita je ve většině center považována za kontraindikaci k transplantaci. (Viklický et al., 2008).

Akcelerovaná rejekce

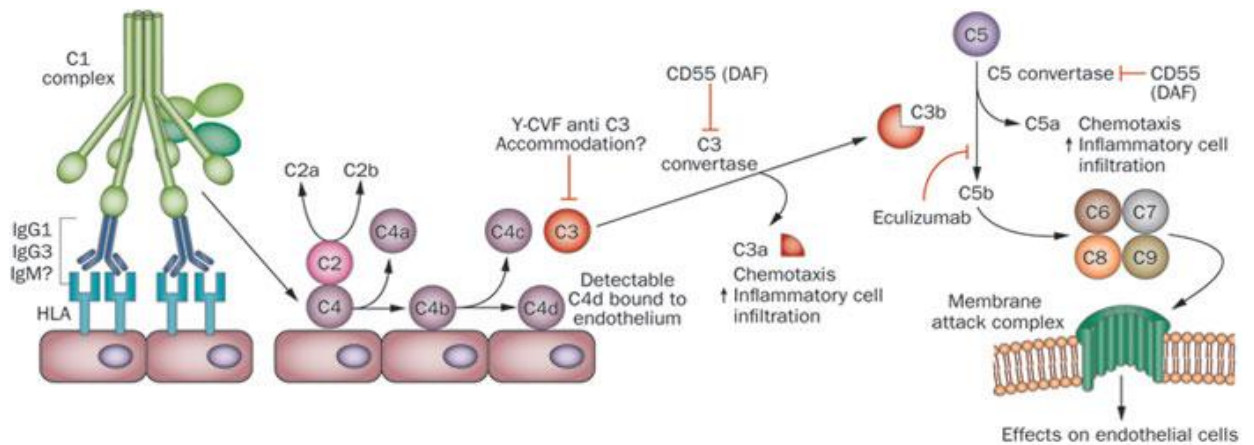
Jedná se o podtyp akutní rejekce, ke které dochází během prvních dnů po transplantaci. Hlavním mechanismem je předpokládána přítomnost paměťových T lymfocytů, které jsou namířeny proti antigenům dárce. Jde o sekundární typ imunitní odpovědi. Je podmíněna předchozí senzibilizací. (Kieslichová et al., 2015)

Akutní humorální rejekce

Akutní humorální rejekce nejčastěji vzniká v průběhu prvních dvou týdnů po transplantaci, ale může vznikat i déle po transplantaci, nejčastěji v prvních 3 měsících. Bývá zprostředkována protilátkami proti neshodným antigenům dárce, tzv. donor specifickými protilátkami (DSA).

Neshodné antigeny dárce jsou rozpoznávány antigen prezentujícími buňkami a předkládány CD4⁺ T lymfocytům příjemce. Pouze CD4⁺ T lymfocyty, které jsou aktivovány přes nepřímé rozpoznávání antigenu, mohou pomáhat ve vývoji B lymfocytů. Naivní B lymfocyt příjemce rozpozná svým imunoglobulinovým receptorem cizí neshodné HLA molekuly dárce, následně je zpracuje a vystaví přes HLA II. třídy na svém povrchu. Dojde k vazbě CD4⁺ T lymfocytu za pomoci jeho TCR, která je zesílena kostimulačními mechanismy CD40 a CD40 ligandy. To vede k produkci cytokinů, diferenciaci B lymfocytu a k produkci protilátek. Může dojít k aktivaci komplementu. Důsledkem je lokální příliv neutrofilů a makrofágů, krvácení a vznik trombů. Dochází k poškození štěpu. Transplantovaný orgán může být poškozován také aktivací MAC komplexu (Membrane attack complex). Ten tvoří póry v membráně buňky, dochází tak k porušení osmotické rovnováhy a lýze buňky.

Různé isotypy protilátek mají odlišnou schopnost aktivovat komplement. Schopnost protilátek isotypů IgM, IgG1 a IgG3 aktivovat komplement je silná. Dochází k zánětlivým změnám na endoteliálních buňkách. Jako průkaz humorální rejekce se používá imunofluorescenční nebo imunohistologická detekce vazby C4d složky komplementu na endotel postižené ledviny (Feucht et al., 1991). Dále se zde uplatňují chemotaktické složky komplementu C5a a C3a, které přitahují leukocyty do místa rejekce (viz Obr. 4).



Obr. 4: Aktivace komplementu donor-specifickými protilátkami vedoucí k poškození štěpu a infiltraci zánětlivých buněk (Stegall, et al., 2012)

Isotypy IgG2 a IgG4 neaktivují komplement. K poškození štěpu poté dochází za pomoci NK (natural killer) buněk a makrofágů. V tomto případě nedochází k ukládání štěpné složky C4d do peritubulárních kapilár štěpu, ale můžeme zde detekovat DSA protilátky v periférii. Tento typ rejekce se proto nazývá C4d negativní protilátkami zprostředkovaná rejekce (Hirohashi et al., 2010). Uplatňují se zde další mechanismy poškození štěpu, jako je například buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC). Principem je vazba protilátek na Fc receptor NK buněk a následné vyjití cytotoxických granulí (perforinů a granzymů) vedoucí k apoptóze (Dos Santos et al., 2016)

2.2.3 Chronická rejekce

K chronické rejekci může dojít měsíce až roky po transplantaci, proto se jedná o hlavní příčinu selhání transplantované ledviny v dlouhodobém období. Tento typ rejekce je multifaktoriální, uplatňují se zde imunologické mechanismy závislé na aloantigenní odpovědi, ale i neimunologické mechanismy. Mezi hlavní faktory způsobující chronickou rejekci patří neshody v HLA antigenech a předchozí epizody akutní rejekce. Dále pak stav štěpu před transplantací, virové infekce, ale i toxické působení léků. K imunologickým faktorům patří složky jak buněčné (makrofágy) tak protilátky a cytokiny (například TGF β). Endotel cév je poškozen, což vede k nedostatečnému prokrvení transplantované tkáně. Funkční tkáň je postupně nahrazována nefunkčním vazivem (proces intestinální fibrózy).

2.2.4 B lymfocyty a jejich úloha v akutní humorální rejekci

Z pohledu buněk, které se účastní odhojování štěpu, můžeme rejekce dělit na humorální a celulární nebo mohou oba typy rejekcí probíhat současně jako smíšená

reakce. Štěp je infiltrován mnoha typy imunokompetentních buněk. Zejména se na odhojování podílejí T lymfocyty, B lymfocyty, makrofágy, NK buňky a eosinofily příjemce. B lymfocyty se účastní obou základních typů reakce, a to jak produkcí protilátek, tak uvolňováním prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Zarkhin et al., 2010). Humorální reakcím je věnována velká pozornost, protože jsou velkým rizikem pro selhání transplantovaných orgánů (Mauiyyedi et al., 2002). Faktorem, který se velmi podílí na odmítnutí štěpu, je komplementová kaskáda. Proto se hledají nové možnosti, jak potlačit humorální odpověď proti antigenům dárce a tak zabránit aktivaci komplementu a poškození štěpu (Stegall et al., 2014).

2.3 B lymfocyty

2.3.1 Vývoj B lymfocytů

B lymfocyty vznikají z lymfoidní linie hematopoetických kmenových buněk. Vývoj z kmenové buňky až po nezralý B lymfocyt se uskutečňuje u člověka v kostní dřeni za pomoci cytokinu (CSF70), který je produkován stromálními buňkami. Pozdější vývoj B lymfocytu je závislý na cytokinu IL-17 také produkováném stromálními buňkami. Nejméně zralou B buňkou je tzv. pro B lymfocyt, který pomocí enzymů RAG 1 a 2 přeskupuje variabilní oblast, která skládá se z VDJ segmentů, ke kterým je přiřazen segment μ , který kóduje Fc fragment těžkého řetězce pro IgM. Tento těžký řetězec je spolu s dočasným lehkým řetězcem exprimován na povrchu pro B lymfocytu jako BCR. Tento B lymfocyt se nazývá pre B lymfocyt. V další fázi opět za pomoci enzymů RAG 1 a 2 dochází k přeskupení lehkého řetězce (VJ). Od tohoto momentu je B lymfocyt nazýván nezralým B lymfocytem. Pokud se v této fázi potká nezralý B lymfocyt s antigenem (nejčastěji autoantigenem), na který se silně váže, je eliminován nejčastěji apoptózou (klonální delece) nebo může být utlumen (Krejsek & Kopecký, 2004, Allman & Miller, 2003).

Zralé B lymfocyty, které prošly sítí selekce a přežily, mají na svém povrchu také imunoglobulin třídy D (přeskupování VDJ u těžkého řetězce pro IgD probíhá stejně jako u IgM). V krátkém období vývoje velmi časných stádií B lymfocytů jsou velmi důležité transkripční faktory (IKAROS,...) a interleukin IL-7, který je rovněž produkován stromálními buňkami. Tyto faktory jsou důležité pro diferenciaci B lymfocytů (Brown et al., 2007, Allman & Miller, 2003). Nezralý B lymfocyt migruje jako transientní buňka cévním řečištěm

do sekundárních lymfatických orgánů (slezina, lymfatické uzliny, Peyerovy pláty, mukózní tkáň, mandle). V sekundárních lymfatických orgánech se nezralé B lymfocyty diferencují na folikulární B lymfocyty a B lymfocyty marginální zóny (BMZ), (Ruddle & Akirav, 2009, Zotos & Tarlinton, 2012) BMZ a folikulární B buňky jsou schopné produkovat pouze povrchové imunoglobuliny izotypu IgM a IgD. Teprve po setkání s antigenem se dále diferencují buď v plazmatické buňky produkující protilátky ostatních izotypů nebo v paměťové buňky, které jsou připraveny jako záloha pro příští setkání se stejným antigenem (Krejsek & Kopecký, 2004).

B lymfocyty mohou být aktivovány i přímo antigenem bez pomoci T lymfocytů. Této protilátkové odpovědi se účastní buňky marginální zóny, které jsou aktivovány antigeny přímo přes svůj BCR. Antigeny jsou obvykle bakteriálního původu (například lipopolysacharidy, polymerní formy bílkovin). Tyto antigeny jsou často schopny polyklonální aktivace BMZ přemostěním většího množství BCR. BMZ po své aktivaci produkují nízkoafinní IgM protilátky. BMZ nejsou schopny izotypového přesmyku. Do aktivace BMZ jsou zřejmě zapojeny i Toll-like receptory (Vos et al., 2000).

2.3.2 Klasické folikulární B lymfocyty

Potřebují pro svou aktivaci kromě vazby antigenu na BCR také spolupráci pomocných T lymfocytů (CD4+, T_H). T_H pomáhají B lymfocytům k jejich vyžráním v plně funkční buňky několika způsoby. Pomoc je ve formě produkce cytokinů (například IL-4, IL-5, IL-21), ale také přímým kontaktem mezi B lymfocyty a T_H lymfocyty (například mezi CD40 a CD40L, který se rovněž nazývá CD154). Díky této pomoci dochází k izotypovému přesmyku z IgM na ostatní izotypy IgG, IgA, IgE. Zároveň protilátky vyžívají do vysokoafinních protilátek (Hořejší et al., 2013).

2.3.3 Naivní B lymfocyty

Před tím, než se naivní B lymfocyt setká se svým antigenem, cirkuluje ve folikulech periferních lymfoidních orgánů. Po navázání antigenu na BCR dochází k pohlcení antigenu B lymfocylem, k jeho zpracování a prezentaci na povrchu cytoplazmatické membrány spolu s MHC II, čímž se B lymfocyt stává antigen prezentující buňkou. MHC II s navázaným peptidem je prezentován T lymfocytům. V lymfoidních orgánech existují specializované T lymfocyty a dendritické buňky (folikulární dendritické buňky), které spolu s folikulárními B lymfocyty tvoří germinální centra. Zde probíhá finální vyžráním protilátek (somatická

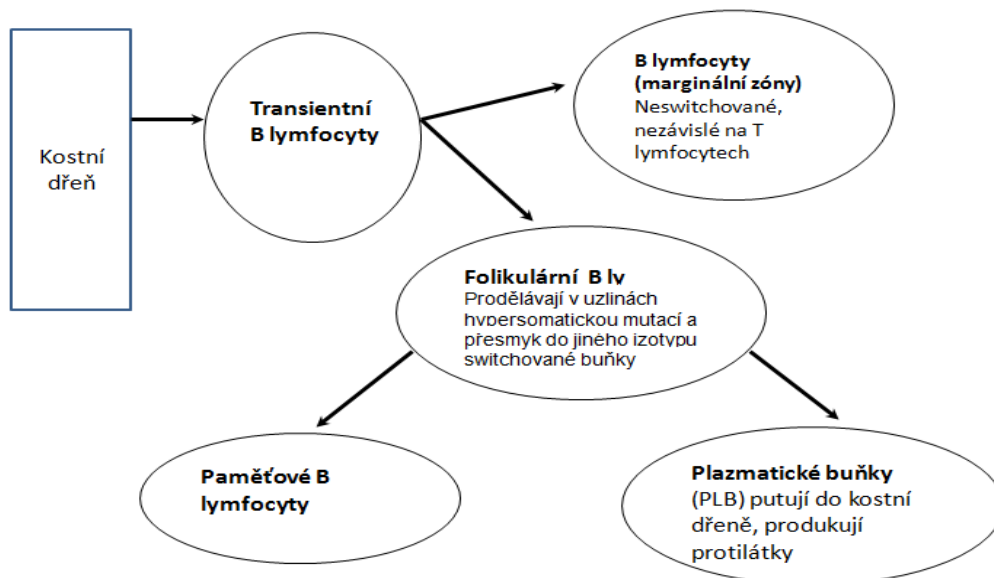
mutace, selekce vysokoafinních buněk a izotypový přesmyk). Z B lymfocytů se stávají buď dlouho žijící paměťové B lymfocyty, nebo plazmatické buňky, které migrují zpět do kostní dřeně, kde produkují vysokoafinní protilátky (Hořejší et al., 2013).

2.3.4 Plazmatické buňky

Jak bylo výše zmíněno, plazmatické buňky se v periferní krvi téměř nevyskytují. V kostní dřeni tvoří pouze 0,5 % jaderných buněk. Jsou to terminálně diferenciované buňky, které se již dále nedělí. Na svém povrchu mají velmi nízkou expresi znaku CD19, neexprimují znak CD20, CD27 a od ostatních B lymfocytů se také liší ztrátou povrchových imunoglobulinů. Naopak mají vysokou hustotu znaků CD38 a CD138. Jejich jedinou funkcí je produkce vysokoafinních protilátek jednoho typu, které odpovídají vazebným místem původnímu vazebnému místu BCR. Protilátky proti některým antigenům (např. protilátky proti HLA) jsou udržovány i mnoho let ve stálé stejné koncentraci (Slifka & Ahmed, 1998, Shapiro-Shelef et al., 2005). V kostní dřeni mohou plazmatické buňky přežívat velmi dlouhou dobu a způsob, kterým umírají, není zatím objasněn. Ke svému přežití nejspíše vyžadují mikroprostředí, které obsahuje IL-6, BAFF, APRIL (Tangye et al., 2011). Výskyt plazmablastů koreluje s cirkulujícími DSA a také s výskytem C4d ve štěpu (Zarkhin et al., 2008).

2.3.5 Paměťové B lymfocyty

Paměťové B lymfocyty neprodukují protilátky, ale po setkání s antigenem se mohou velmi rychle přeměnit na plazmatické lymfocyty a začít potřebné protilátky produkovat. Pravděpodobně až 25 % B lymfocytů v oběhu jsou právě paměťové B lymfocyty. Tyto buňky jsou velmi dlouho žijící (Hořejší et al., 2013). Paměťové B lymfocyty exprimují na svém povrchu znaky CD19, CD20 a CD27. Paměťové B lymfocyty jsou zodpovědné za rychlé zvýšení hladiny DSA v séru u předem senzitivovaných pacientů. V důsledku toho dochází k rychlému rozvoji protilátkami-zprostředkované rejekce (Burns et al., 2008).



Obr. 5: Schéma vývoje B lymfocytů

2.3.6 Sledované znaky na B lymfocytech

CD19	funkce	regulace vývoje, aktivace, diferenciacie (v komplexu s D21,CD81...), spolu s BCR zvyšuje vnímavost k aktivaci antigenem
	výskyt	na všech B lymfocytech včetně pro-B lymfocytů, snížená exprese po maturaci do plazmatických buněk
CD21	funkce	na CD4+ T ly nezávislá aktivace B lymfocytů (obrana proti antigenům s repetitivní polysacharidovou strukturou)
	výskyt	hlavně na T2 B lymfocytů a B lymfocytů marginální zony (receptor pro C3d složku komplemtu)
CD24	funkce	neznámá
	výskyt	všechna stádia B lymfocytů s výjimkou plazmatických buněk
CD27	funkce	patří do rodiny TNF receptorů
	výskyt	plasmatické B lymfocyty
CD38	funkce	enzym s mnoha aktivitami
	výskyt	transientní buňky a plasmatické B lymfocyty
CD257/ BAFF	funkce	podporuje maturaci, přežití a aktivaci B lymfocytů
	výskyt	B lymfocyty a T lymfocyty

Tabulka 2: Funkce a výskyt CD znaků na B lymfocytech (Upraveno z Vlkova, 2010).

2.4 Úloha BAFF v buněčné biologii B LYMFOCYTŮ

2.4.1 BAFF a APRIL

Původně se považovalo za jisté, že exprese BCR na B lymfocytech je dostatečná pro přežití a rozvoj B lymfocytů v periférii. Tato představa byla později přehodnocena, když byla objevena rodina B buněčných aktivačních faktorů patřících k rodině Tumor Necrosis Factor (TNF) jako je například BAFF (také nazýván BlyS, Tall-1, TNF-4, THANK, TNSF 13b). Tyto nové poznatky posunuly naše chápání toho, které faktory jsou také důležité pro B lymfocytární maturaci a přežití v periférii. (Bossen et al., 2008, Mackay et al., 2009)

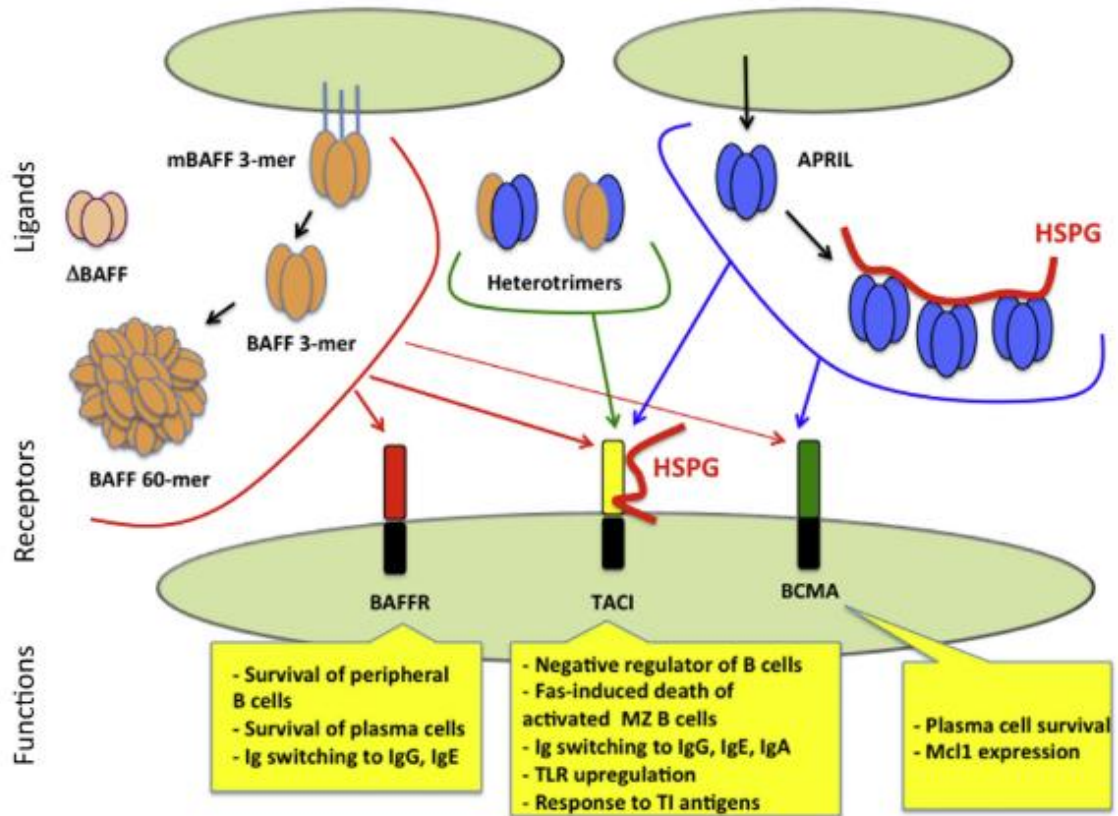
Ligandy

BAFF je popsán jako ligand vázaný na membránu nebo se vyskytuje v solubilní formě. BAFF je složen z 285 aminokyselin. Solubilní BAFF je uvolňován jako peptidový zbytek obsahující 152 aminokyselin (Moore et al, 1999, Schneider et al, 1999). Solubilní BAFF je aktivní ligand v podobě homotrimeru. Toto je nejčastější forma BAFF, kterou můžeme vidět v cirkulaci. Na interakcích mezi BAFF trimery se podílejí vodíkové vazby, sodíkové můstky a hydrofobní vazby. Za fyziologických podmínek (pH) se solubilní BAFF sdružuje do 60-meru (viz Obr. 6) a tato forma se také váže na receptory (Liu et al., 2002). Solubilní 60-merní forma je za fyziologických podmínek stabilní, zatímco v kyselém prostředí se rozpadá zpět do své výchozí trimerní podoby. Solubilní 60-merní BAFF je neaktivnější forma BAFF, pravděpodobně protože vzniká za fyziologických podmínek. Pokud za normálních podmínek roste lokálně koncentrace solubilního BAFFu a jeho 60-merní formy, dá se očekávat zvýšená signalizace přes BAFF/APRIL receptory (obzvláště TACI) (Liu et al., 2002).

BAFFu podobný ligand, který také vyvolává proliferaci buněk, se nazývá APRIL (jeho synonyma jsou TALL-2, TRDL-1, TNFSF13a). Je to heterotrimerní ligand, taktéž člen TNF superrodiny. Je produkován jako transmembránový protein, který je štěpen již v Golgiho aparátu a uvolňován z buňky pouze jako solubilní faktor. Neštěpený APRIL je složen z 250 aminokyselin. Jeho solubilní forma je uvolňována jako 146 aminokyselinový zbytek (17 kDa) (López-Fraga et al., 2001).

Oblast DNA, která kóduje APRIL, je situována blízko oblasti pro TWEEK (jiný člen superrodiny TNF). Může se stát, že variantní sestřih vede ke vzniku hybridního ligandu APRIL/TWEEK, který se jmenuje TWE-PRIL. Výsledná podoba tohoto hybridu vypadá tak,

že jeho extracelulární část je zajišťována APRILEm a transmembránová část zajišťována TWEEKem. Biologická aktivita je tedy podobná APRILu (Pradet-Balade et al., 2002). Význam tohoto ligandu je zatím neznámý.



Obr. 6: Ligandy a receptory BAFF/APRIL systému a jejich funkce (Převzato z Molecular Biology of B cells, Frederick. W. Alt. et al, 2015)

Zdroje BAFFu a APRILu

BAFF a APRIL jsou produkovány celou řadou hematopoetických i nehematopoetických buněk (Mackay et al., 2009). Buňky myeloidní řady produkují největší množství BAFFu. Mezi největšími producenty BAFFu a APRILu jsou tedy hlavně monocyty, makrofágy, dendritické buňky, žírné buňky, eozinofily a astrocyty (Nardelli et al., 2001. Lavie et al., 2008. Huard et al., 2004. Ng et al., 2004. Scapini et al., 2003). Tyto buňky se účastní v přirozené imunitní odpovědi. Ovšem nepodílejí se na dlouhotrvající specifické imunitě, jsou určeny k okamžité rychlé akci. Tyto antigen prezentující buňky produkcí BAFFu stimulují T lymfocyty k jejich aktivaci a přežití (Ng et al., 2004. Sutherland et al., 2005). BAFF má zároveň vliv na aktivaci přirozené imunity, například má vliv na přežívání monocytů, produkci prozánětlivých cytokinů (Chang et al., 2006). Stimulace příslušných

buněk k syntéze solubilního BAFFu je navozena například interferonem gamma, IL-10, CD40L (Morimoto et al., 2007). Také patogen asociované molekulární vzory (PAMPy), jako jsou lipopolysacharidy (LPS) či peptidoglykany, navozují zvýšenou syntézu BAFFu a APRILu monocyto\makrofágovým systémem a dendritickými buňkami. Aktivace probíhá přes Toll- like receptory (TLR) (Groom et al., 2007, Hardenberg et al., 2007, Katsenelson et al., 2007). TLR jsou důležité hlavně pro buňky marginální zóny (subpopulace B lymfocytů nezávislá na T lymfocytech), které jsou lokalizovány hlavně v sínech sleziny, kam krev přináší patogeny. Aktivace buněk marginální zóny přes TLR je velmi strategická hostitelská odezva na patogen, který je přinášen krví. Může to vysvětlovat proč BAFF hraje velmi důležitou úlohu ve zvýšení exprese TLR na povrchu buněk (Groom et al., 2007).

BAFF a APRIL jsou rovněž produkovány astrocyty jako součást jejich aktivní role při přirozené obraně mozku. BAFF spolu s dalšími proinfekčními cytokiny může být odpovědný za zaměření adaptivní imunity na CNS při jeho zánětu (Krumbholz et al., 2005, Farina et al., 2007).

Aktivované T lymfocyty mohou produkovat hlavně APRIL a TWEPRIL. Současné studie také ukazují, že T_H buňky v germinálních centrech jsou důležitým zdrojem BAFF pro folikulární B lymfocyty, kterým pomáhají k vyšší afinitě navozené somatickými hypermutacemi. Toto zjištění naznačuje, že během afinitního vyzrání klony B buněk spoléhají na BAFF produkováný T_H (Goenka et al., 2007).

BAFF i APRIL ovlivňují funkce T lymfocytů a také jejich přežívání (Huard et al., 2004. Stein et al., 2002). Po přidání exogenního BAFF k aktivovaným T lymfocytům ze sleziny, dochází ke zvýšení exprese Bcl-2 (anti-apoptotický protein), takže se dá předpokládat pozitivní vliv BAFF na přežívání T lymfocytů (Ng et al., 2004).

Receptory pro BAFF a APRIL

Ligandy BAFF a APRIL sdílejí dva typy receptorů - TACI a BCMA (TNFRSF17), ale váží se na ně s různou afinitou. APRIL se váže silně na receptor BCMA, na TACI jen slabě. U BAFFu je to naopak, silněji se váže na TACI, ale s receptorem BCMA tvoří jen slabou vazbu (Bossen et al., 2006. Schneider et al., 2001). Kromě toho se BAFF váže s nejvyšší afinitou na třetí typ receptoru - BAFF-R (TNFRSF13C) (Bossen et al., 2006).

BAFF preferuje vazbu s receptory BAFF-R a TACI a má slabší afinitu k receptoru BCMA (100 krát nebo 1000 krát slabší). APRIL se váže srovnatelně s TACI i BCMA (Bossen et al.,

2006). Vzhledem k tomu, že TACI jako jediný receptor relativně se stejnou afinitou váže jak APRIL tak BAFF, dá se předpokládat, že heterotrimery těchto ligandů jsou specifické pro TACI (Roschke et al., 2002).

DxL motiv na BAFF-R, TACI a BCMA je rozhodující pro navázání BAFF a APRIL. DxL motiv je velmi konzervovaný. V případě receptoru TACI je tato vazba podpořena ještě pomocí dalších dvou aminokyselin. Interakce mezi BAFF/APRIL a jejich receptory probíhá přes konzervované na cystein-bohaté domény (CRDs) v extracelulární části těchto receptorů a každá obsahuje DxL motiv. Proteiny TNF receptorové super rodiny obvykle obsahují tři nebo šest CRDs. TACI obsahuje dvě CRDs, BCMA obsahuje jedinou CRDs a BAFF-R obsahuje částečnou CRD. Kompletní CRDs jsou složeny asi ze 40 aminokyselinových zbytků (Hymowitz et al., 2005).

2.4.2 Exprese receptorů na B lymfocytech

Receptor BAFF-R

BAFF-R se účastní pozitivní regulace během B-buněčného vývoje. BAFF-R je dominantní receptor, který je exprimovaný na povrchu maturovaných B lymfocytů (NG et al., 2004, Cancro, 2004). BAFF-R není exprimován na prekurzorech B lymfocytů v kostní dřeni, ale objevuje se na nematurovaných B lymfocytech, které se mění na transientní B lymfocyty 1. typu. BAFF-R je základem pro přežití a maturaci nematurovaných B lymfocytů (Batten et al., 2000).

Receptor TACI

Receptor TACI podporuje u B lymfocytů přesmyk (switch) do dalších subtříd imunoglobulinů (IgG, IgA, IgE). Zároveň má tento receptor pravděpodobně důležitou funkci při snižování počtu B lymfocytů nasměrováním buněk do apoptozy (Seshasayee et al., 2003). Současné studie ukazují, že TACI se účastní v regulaci počtu B lymfocytů nepřímo tím, že zvyšuje expresi Fas a Fas ligandu na povrchu LPS aktivovaných buněk marginální zóny (Figget et al., 2013).

TACI je exprimován na lidských paměťových buňkách, které u zdravých jedinců zároveň exprimují vyšší koncentraci Fas (Figget et al., 2013, Darce et al., 2007). TACI je také exprimován na subpopulacích B lymfocytů (například CD27 neg) (Darce et al., 2007). Další buněčnou linií, která exprimuje TACI jsou makrofágy, kde má vliv na jejich přežití (Chang et al., 2006).

Expresce TACI je silně zvyšována na povrchu B lymfocytů pokud jsou aktivovány přes mnoho TLR. Z tohoto pohledu hraje TACI významnou úlohu při aktivaci B lymfocytů marginální zóny (Groom et al., 2007, Katsenelson et al., 2007).

Receptor BCMA

Expresce receptoru BCMA je redukována na B lymfocyty germinálních center, plazmablasty a je vysoce exprimovaná na prekurzorových B lymfocytech v kostní dřeni (Mackay et al., 2003. Zhang et al., 2005). Oproti tomu není BCMA exprimovaná na slezinných B lymfocytech (Sadanlick et al., 2008). BCMA je zřejmě velmi důležitá pro přežití dlouho žijících prekurzorových B lymfocytů v kostní dřeni (O'Connor et al., 2004). BCMA pravděpodobně může hrát roli v prezentaci antigenu B lymfocyty, protože na rozdíl od TACI a BAFF-R je jako jediná schopná aktivovat JNK (Janus kinázy) signalizační nitrobuňčnou dráhu, která vede k indukci odpovědi na prezentovaný antigen (Yang et al., 2005).

2.4.3 Expresce receptorů na T lymfocytech

Expresce BAFF-R se také zvyšuje na aktivovaných T lymfocytech. Role BAFF-R na aktivovaných T lymfocytech vede k expresi Bcl-2 a k produkci T_H1 cytokinového spektra CD4 T lymfocyty (Ng et al., 2004).

2.4.4 Role BAFF-APRIL systému v životě B lymfocytů zdravého jedince

Maturace a přežití B lymfocytů

Hlavní funkcí BAFF je přežití B lymfocytů během jejich maturace (Batten et al, 2000. Gross et al, 2001). BAFF receptor se objevuje na nematurovaných stádiích B lymfocytů, které musí projít diferenciací před dosažením finálních maturovaných stádií (paměťové buňky, plazmablasty) (Mackay et al, 2003, Thompson et al., 2001). Nematurovaná diferenciací stadia B lymfocytů se nazývají transientní buňky, které se dělí do tří po sobě následujících typů (Allman et al., 2008). Přežití druhého a třetího stadia transientních buněk je závislé právě na signalizaci mezi BAFF-R a BAFF (Mackay et al., 2009, Batten et al., 2000). Expresce Bcl2 může zachránit maturaci B lymfocytů u BAFF-deficientních jedinců. Toto naznačuje, že BAFF není jediným důležitým faktorem pro přežití B lymfocytů. Ovšem je důležitým faktorem v diferenciaci buněk marginální zóny (Tardivel et al., 2004).

Aktivace BAFF-R vede k aktivaci NF-kappaB2 a následnému přepisu anti-apoptotických genů z rodiny Bcl2 (Kayagaki et al., 2002, Gardam et al., 2008).

BAFF zároveň řídí přežití B lymfocytů blokováním BCR, která je zvyšována působením proapoptotické molekuly Bim. Zároveň preventivně jsou rozmístěny proapoptotické protein kinasy Cdelta do jádra (Craxton et al., 2005, Mecklenbrauker et al., 2004). Vyšetření B lymfocytů korelované s výsledky BAFF ukazují na zvětšení velikosti B buněk a jejich metabolické aktivity (Patke et al., 2006). Recentní výsledky ukazují, že BCR a BAFF signalizují do buňky pomocí „Scr family tyrosine kinase“ (Schweighoffer et al., 2013, Infantino et al., 2013).

Aktivace B buněk

Některé práce ukazují, že BAFF iniciuje spuštění aktivace B lymfocytů „*in vitro*“ v kulturách (Schneider et al., 1999). Ovšem, jak moc je důležitý BAFF pro spuštění aktivace B lymfocytů „*in vivo*“ není zatím zcela jasné, vzhledem k dalším známým kostimulačním signálům nutným pro aktivaci B lymfocytů, jako jsou například CD40 ligand a IL4. Kooperace všech složek podílejících se na aktivaci B lymfocytů není zatím zcela známa (Gross et al., 2001).

Exprese receptoru BCMA hraje významnou roli v konečných stádiích B buněčné aktivace a řídí přežití plazmablastů v kostní dřeni (O’Conor et al., 2004, Thompson et al., 2000).

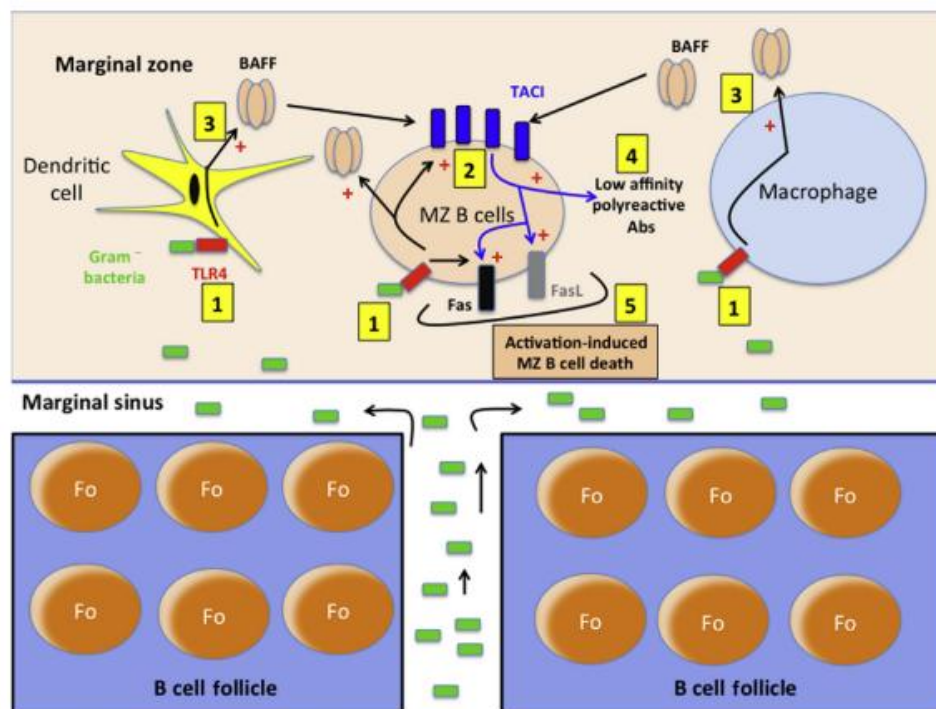
2.4.5 Role BAFF-APRIL systému v životě B lymfocytů nemocného jedince

BAFF a B buněčná tolerance

Imunitní systém produkuje denně nové lymfocyty. Mnoho nově vytvořených lymfocytů se váže na struktury těla vlastní. Proto existuje mnoho kontrolních bodů, kde jsou tyto buňky eliminovány nebo neutralizovány. Takto je navozena imunitní tolerance. Tento proces probíhá na různých místech těla, například v kostní dřeni a slezině. Je popsáno mnoho mechanismů, které zajišťují B buněčnou toleranci od selekce klonů reagujících silně s povrchovými strukturami buněk (klonální delece) až po odstranění B lymfocytů, které reagují s povrchovými strukturami slabě, leč stále představují riziko vzniku autoimunity. Tyto B lymfocyty jsou nasměrovány pomocí cytokinu k buněčné sebevraždě. Další způsoby navození B buněčné tolerance jsou pozorovány na periférii, kde dochází u B lymfocytů k navození anergie. Anergie je imunologický pojem, který popisuje neschopnost reakce imunokompetentních buněk reagovat proti cizí látce. Tento jev je zapříčiněn přímou indukcí tolerance v periferních lymfocytech. Imunitní systém je v případě anergie neschopný reakce

proti určitému antigenu, většinou autoantigenu. Lymfocyty jsou považovány za anergické v případě, když nejsou schopny reagovat na antigen, vůči kterému jsou specifické. Anergie je jeden ze tří procesů, které způsobují toleranci, čímž zabraňují sebepoškození organismu imunitním systémem. (Goodnow et al., 1995, Cornall et al., 1995). Jak bylo zmíněno výše, BAFF je faktorem, který řídí přežití a maturaci B lymfocytů. Ovšem počáteční stádia B lymfocytů, které se vyvíjejí v kostní dřeni, nemají na svém povrchu BAFF-R tudíž BAFF nejsou schopny vázat (Ng et al., 2004).

Některé B lymfocyty, které vážou velmi slabě antigeny organismu vlastní, nejsou eliminovány. Tyto buňky se potom velmi často vyvíjejí jako buňky marginální zóny (Thien et al., 2004). Buňky marginální zóny (Obr. 7) jsou nazývány jako „innate like B lymphocytes“, protože jsou velmi účinně aktivovány přes TLR4 jako odpověď na LPS (Kearney, 2005, Martin & Kearney, 2002, Oliver et al., 1997). Navíc buňky marginální zóny velmi dobře fungují jako antigen prezentující buňky pro naivní B lymfocyty, čímž propojují přirozenou a adaptivní imunitu.



Obr. 7: Aktivace indukovaná B buněčná smrt řízená TACI na B buňkách marginální zóny (Převzato z Molecular Biology of B cells, Frederick et al., 2015)

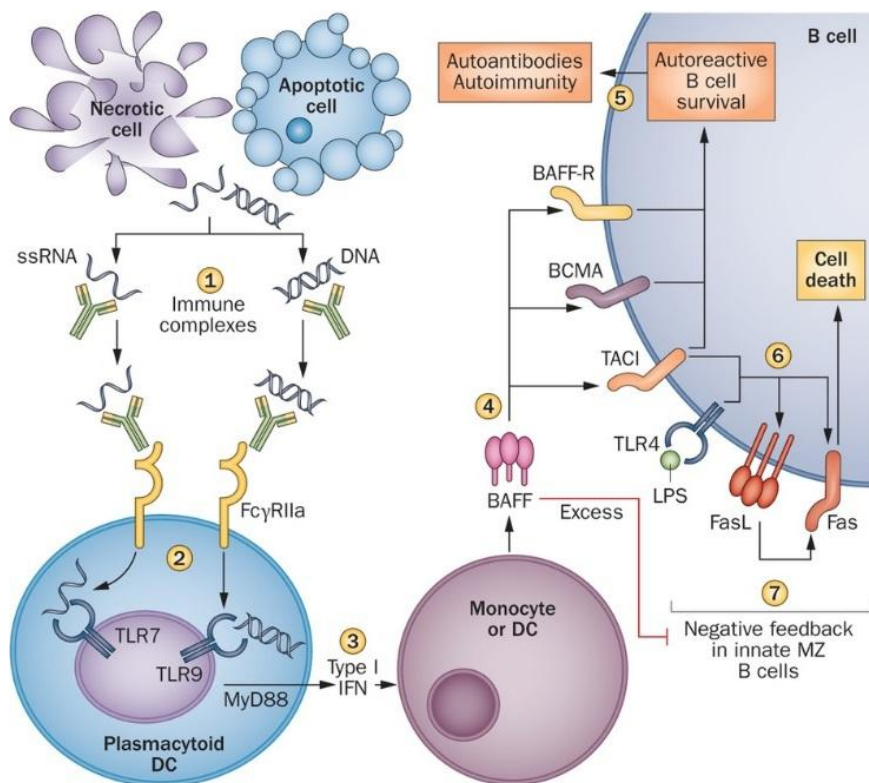
Je otázka, zda buňky marginální zóny, které jsou schopny se vázat na struktury vlastní organismu, byť slabou vazbou, se můžou po aktivaci přes TLR a za pomoci T lymfocytů, stát buňkami produkujícími vysokoafinní autoimunitní protilátky. Avšak je pravda, že většina infekcí vyvolaná gramm-negativními bakteriemi nevede k rozvoji autoimunitních onemocnění. Nabízí se tedy otázka, jak je aktivace buněk marginální zóny regulovaná. Autoprotilátky, jako například protilátky proti jaderným antigenům, jsou často pozorovány v průběhu infekcí, ale tyto autoprottilátky mají pouze přechodný charakter a po vyléčení infekce vymizí (Rose, 2010). Je zřejmé, že regulační mechanismy, které ovlivňují vývoj takových buněk, jako jsou právě buňky marginální zóny, nejsou dostatečně známé. Nové práce ukazují, že buňky marginální zóny exprimují na svém povrchu vysokou koncentraci TACI. Navíc vystavení těchto buněk LPS vede k dalšímu nárůstu TACI na jejich povrchu. Důvod tohoto nárůstu je zatím neznámý. Expres TACI na povrchu buněk je zřejmě důležitá pro optimální expresi Fas a FasL (Figget et al., 2013). Dřívější práce ukazují, že vystavení buněk marginální zóny LPS vede k velmi rychlé aktivaci těchto buněk, ovšem na druhou stranu také rychlému přechodu do apoptózy (Figget et al., 2013, Oliver et al., 1997). Signalizace přes TACI hraje zřejmě roli v nasměrování buňky do apoptózy. Současné poznatky ukazují na to, že signalizace přes TACI má dvě základní funkce: 1) zvyšuje se expres Fas a FasL na povrchu buněk a 2) dochází k potlačení exprese intracelulárních anti-apoptotických faktorů. BAFF a APRIL mohou spouštět tento proces (Figget et al., 2013).

Celý proces aktivace buněk marginální zóny začíná kontaktem gramm-negativních bakterií s makrofágy a dendritickými buňkami ve slezině. Tyto buňky odpovídají produkcí BAFF a APRIL (Mackay et al., 2009). LPS z gramm-negativních bakterií se váže na TLR-4 na povrchu buněk marginální zóny, čímž tyto buňky aktivuje, ale zároveň vyvolává zvýšenou expresi TACI (Figget et al., 2013). Buňky marginální zóny, které jsou aktivované LPS, začnou produkovat nízkoafinní polyreaktivní protilátky třídy IgM, které rozpoznávají konzervativní struktury na povrchu bakterie (Oliver et al., 1997). Protilátky bakterií opsonizují. Zároveň buňky marginální zóny fungují jako antigen prezentující buňky, čímž jsou schopny aktivovat adaptivní část imunitního aparátu. Zároveň s aktivací buněk marginální zóny přes TLR-4 dochází ke zvýšení exprese Fas a FasL a snížení intracelulárních anti-apoptotických faktorů (XIAP, cFLIP). Následně buňka umírá, takže nemůže migrovat do T lymfocytární zóny, kde by mohla dostat pomoc od T lymfocytů, aby vyžrála k produkci vysokoafinitních protilátek. Na závěr lze shrnout, že signalizace přes TACI pravděpodobně vede k regulaci a terminální aktivaci buněk marginální zóny.

Ostatní B lymfocyty nejsou závislé na TACI-signalizaci pro nasměrování do apoptózy. Existují zde TACI nezávislé mechanismy. Není tedy jasné, zda TACI má význam v regulaci B buněčné odpovědi jako celku.

BAFF a B buňkami zprostředkovaná autoimunita u myši

Dysregulace funkcí T a B lymfocytů se podílí na vzniku takových autoimunitních onemocnění jako je na příklad Systémový lupus erythematoses (SLE) (Nagy et al., 2005), (viz Obr. 8). BAFF je produkován aktivovanými T lymfocyty, které zároveň po aktivaci zvyšují expresi BAFF-Ru. BAFF, který se váže na BAFF-R na povrchu T lymfocytů vede k produkci důležitých cytokinů Th1 jako jsou například interferon gama (Ng et al., 2004, Mackay & Leung, 2006). Tyto aktivované T lymfocyty potom hrají důležitou roli v rozvoji autoimunitního onemocnění. Dysregulace mezi B a T lymfocyty zřejmě vede k produkci patologických autoprotilátek (Nagy et al., 2005). Jak je zmíněno výše, aktivované T lymfocyty produkují BAFF a APRIL a jejich následná signalizace přes TACI je důležitá pro izotypový přesmyk (He et al., 2010). Je možné, že nadměrná produkce BAFF vyvolává zpětně nadprodukcí BAFF T lymfocyty a to vede k přesmyku na autoprotilátky v subtrídách IgG1 a IgG2.



Obr. 8: Úloha BAFF v patogenezi SLE (Převzato z The BAFF/APRIL system in SLE pathogenesis, Fabien et al., 2014)

Je také známo, že dochází ke zvýšení hladiny IgA, což je významné u ledvinných nefropatií. Zatím co u myši, které mají sníženou hladinu IgA, jsou renální patologie sniženy. IgA nefropatie u člověka koreluje se zvýšenou hladinou APRIL v séru a jsou častější u mužů. Je zajímavé, že u BAFF transgenních myši také platí, že samci jsou častěji ohroženi ve srovnání se samicemi. Zřejmě to souvisí s různou expresí BAFF u transgenních samců a samic (McCarthy et al., 2011).

Role BAFF/APRIL systému v B buňkami zprostředkovaných imunodeficiencích

CVID je jedním z nejčastějších imunodeficitních onemocnění. Je charakterizován sníženou tvorbou protilátek (obzvláště IgG, IgA a IgM) po očkování, stejně jako náchylností k infekcím obzvláště dýchacího traktu. CVID je zároveň až v 20 % případů komplikován autoimunitními chorobami (Scharenberg et al., 2006). Etiologie CVID je zatím nejasná, ale je pravděpodobně způsobena některými genetickými defekty, které ovlivňují imunologické funkce. Mutace a delece některých genů ovlivňující B buněčné funkce mohou být asociované právě s CVID (Woo et al., 2011). Současné znalosti mechanismů vzniku CVID jsou spojovány s mutacemi v genu kódujícím TACI. Tyto mutace byly nalezeny zhruba u 10 % pacientů s CVID. Variace způsobené mutacemi byly zjištěny jak v extracelulární doméně tohoto receptoru, ale zároveň i v transmembránové doméně (Salzer et al., 2005, Zhang et al., 2007, Martínez-Pomar 2009, Pan-Hammarstrom et al., 2007, Garibyan et al., 2007). Ovšem nelze zjednodušit mechanismus vzniku CVID pouze na mutace v genu pro TACI bez dalších imunologických abnormalit (Martinez-Gallo et al., 2013, Park et al., 2011).

BAFF-R je základní receptor pro přežití B lymfocytů. Mutace v genu pro BAFF-R je důležitý faktor při vzniku imunodeficience. Tyto mutace bývají dávány do souvislosti s nízkým počtem B lymfocytů (Losi et al., 2005). Ačkoliv některé varianty BAFF-R stojí za rekurentními infekcemi, jiné jsou prakticky asymptomatické. Kromě sníženého počtu B lymfocytů mohou také ovlivnit koncentraci IgG a IgM, zatímco koncentrace IgA zůstává nezměněna (Warnatz et al., 2009).

Na závěr lze říci, že mutace v genech pro TACI i BAFF-R mají význam při vzniku CVID, ale jsou potřeba ještě další faktory, aby se CVID klinicky manifestoval.

2.4.6 BAFF v transplantacích

Současná imunogenetická vyšetření pacientů před transplantací zahrnují kromě HLA typizace, také detekci HLA-specifických protilátek různými metodami. Avšak tato vyšetření neposkytují informaci o B buňkách, které se účastní humorální odpovědi

proti transplantovanému orgánu. Vzhledem k tomu, že je prokázáno, že BAFF hraje důležitou roli při proliferaci, maturaci a diferenciaci B buněk, víme jen málo, jakou úlohu má solubilní BAFF a jeho receptory při transplantaci a případném rozvoji humorální rejekce.

Je otázka, zda by měření koncentrace solubilního BAFF mohlo sloužit jako marker protilátkami-zprostředkované rejekce (AMR) u pacientů po transplantaci ledviny.

Některé práce naznačují, že je u pacientů s anti-HLA protilátkami a vyššími hladinami solubilního BAFF vyšší pravděpodobnost vývoje AMR. Neutralizace solubilního BAFF by u těchto pacientů mohla být zajímavou terapeutickou strategií, která by mohla zabránit rozvoji AMR, a to zejména proto, že tyto látky jsou k dispozici a byly již použity v léčbě autoimunity (Banham et al., 2013, Thibault-Espitia et al., 2012). Další studie naznačují, že neutralizace solubilního BAFF/APRIL může být aplikována pro zvýšení účinnosti CD40 / CD154(CD40L) kostimulační blokády a zlepšení přežití štěpu u T buněk senzibilizovaných příjemcům (Gorbacheva et al., 2015). Pilotní studie, do které bylo zařazeno 8 pacientů po transplantaci ledvin, ale ukázala, že využití Belimumabu (humanizovaná monoklonální protilátka, která inhibuje BAFF) v monoterapii byla ukončena a to z důvodu nedostatečné účinnosti. Proto bude potřeba provést další studie, které eventuálně prokážou, zda pacienti po transplantaci orgánů, můžou mít prospěch z blokády solubilního BAFF, pravděpodobně v kombinaci s jinými imunosupresivními preparáty, tak jako to bylo již použito u některých autoimunitních onemocnění (Lateef et al., 2010, Ginzler et al., 2012). Jiné práce ale neprokázaly, že by se hladina solubilního BAFF měřeného před transplantací lišila u pacientů s následnou AMR a pacientů bez rejekce (Snaunoudj et al., 2014).

3 Cíle diplomové práce

Předložená diplomová práce se zabývá hodnocením rizika vývoje akutní protilátkami zprostředkované rejekce u pacientů po transplantaci ledviny.

Konkrétní cíle:

1. Zjistit, zda lze hladiny BAFF cytokinu použít jako marker humorální rejekce.
2. Změřit hladiny BAFF v séru před transplantací u skupiny pacientů s diagnostikovanou rejekcí a porovnat je s koncentracemi u kontrolní skupiny pacientů bez rejekce.
3. Analyzovat hladiny BAFF cytokinu v porovnání s klinickým průběhem po transplantaci, zjistit, zda existuje signifikantní korelace mezi koncentracemi BAFF a incidencí humorální rejekce.
4. Za využití průtokové cytometrie detekovat vázané formy BAFF u jednotlivých subpopulací B lymfocytů (transientní, naivní, neswitchované, switchované a plazmatické) a porovnat je s hladinami solubilní formy BAFF. Sledování změn u pacientů s akutní humorální rejekcí a bez rejekce.

4 Experimentální část

4.1 Experiment 1 – solubilní BAFF

První část diplomové práce navazuje na diplomovou práci **Mgr. Jitky Brožové: Role B buněk v transplantačních reakcích**. V retrospektivní analýze byly zkoumány hladiny faktoru BAFF před transplantací a po transplantaci. Tato data naznačují, že pacienti v průběhu humorální rejekce mají nižší hladiny solubilního BAFF cytokinu oproti pacientům bez rejekce (Brožová, 2014).

Do naší retrospektivní studie jsme zahrnuli 92 pacientů (33 žen, 59 mužů), které jsme sledovali v časových intervalech: před transplantací, 3 měsíce, 6 měsíců a rok po transplantaci. Pacienti byli ve věkovém rozmezí 19-76 let. Jednalo se o pacienty, kteří podstoupili transplantaci ledviny mezi roky 2004-2005 v IKEM. Výskyt rejekčních epizod a přežití štěpu byl sledován po dobu 7 let. Přítomnost donor-specifických protilátek byla definována za využití CDC (komplement dependentním cytotoxickým) crossmatch testem a u vybraných pacientů FCXM (crossmatch testem za využití průtokové cytometrie).

HLA protilátky byly stanoveny metodou LabScreen (zpočátku MIX, cut off byl stanoven nad 500 mean fluorescence intensity (MFI) a následovně testy Single antigen 1. třídy – cut off nad 1000 MFI, Single antigen 2. třídy – pozitivita nad 2000 MFI). K posouzení, zda HLA protilátky jsou opravdu namířené proti neshodným antigenům dárce, byla porovnána HLA typizace dárce s HLA antigeny příjemce ledviny. Určení HLA antigenů se provádí metodou PCR-SSP (dárce) a PCR-SSOP (pacient).

Pacienti s protilátkami-zprostředkované rejekce (n=13) byli vybráni na základě nálezu C4d depozit v peritubulárních kapilárách transplantované ledviny (imunoflorescenční detekce) a detekci donor specifických protilátek (DSA) v sérech pacientů. Rejekce nebyla diagnostikována u 60 pacientů.

Solubilní BAFF byl stanoven ze séra získaného z periferní krve pacientů. Hladiny sBAFF byly stanoveny pomocí Xmap metodiky na přístroji Luminex.

4.2 Experiment 2 – membránově vázaný BAFF

V druhé části diplomové práce byl analyzován vztah mezi solubilním BAFF a membránově vázaným BAFF na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů (transientní, naivní, neswitchované, switchované a plazmatické) u pacientů s akutní humorální rejekcí a pacientů bez rejekce.

Do této skupiny bylo zařazeno 20 pacientů (12 mužů, 8 žen) transplantovaných v IKEM v roce 2016. BAFF byl měřen před transplantací, týden po transplantaci, 3 měsíce po transplantaci a v době rejekce.

Periferní krev byla odebrána do zkumavek s EDTA, zpracována (izolace mononukleárních buněk) a měřena na průtokovém cytometru Cyan ADP 9C (Beckman Coulter, Brea, CA). Solubilní BAFF byl stanoven z plazmy získané z periferní krve pacientů a měřen pomocí Xmap metodiky na přístroji Luminex.

5 Použité přístroje a chemikálie

5.1 Přístroje, materiál

- Centrifuga Megafuge 1.ORS, Heraeus Instruments
- Centrifuga Minispin, Eppendorf
- Luminex 200 IS 2.3, One Lambda
- Průtokový cytometr Cyan ADP 9C (Beckman Coulter)
- Třepačka ZX3, Velp Scientifica
- Zkumavky, pipety, špičky a běžný laboratorní materiál

5.2 Chemikálie

- Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norway)
- LABScreen® Single Antigen Class I, One Lambda (Canoga Park, CA, USA)
- Phosphate Buffered Saline (CellWash; Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- Destilovaná voda, Lékárna IKEM
- CellWash (BD Biosciences, San Diego, CA)

Sada Luminex® Performance Assay – Human Biomarker Base Kit A, R&D Systems

- Standard Cocktail
- Diluent RD2-5
- Calibrator Diluent RD60-6
- Streptavidin – fykoerytrin (PE)
- Koncentrovaný promývací pufř
- 96-jamková destička, lahvička na míchání, lepicí fólie
- Mikrokuličky s navázanou protilátkou proti BAFF
- Biotinylovaná detekční protilátka

Protilátky

- CD45-KromeOrange (clone J-33; Beckman Coulter, Brea, CA)
- CD19-ECD (clone J3-119; Beckman Coulter, Brea, CA)
- CD27-PC7 (clone 1A4CD27; Beckman Coulter, Brea, CA)

- CD21-PacificBlue (clone BL13; Beckman Coulter, Brea, CA)
- CD38-APC-AF750 (clone LS198-4-2; Beckman Coulter, Brea, CA)
- CD24-APC (clone ALB9; Beckman Coulter, Brea, CA)
- CD257-PE (clone T7-241, Biolegend, San Diego, CA)
- IgD-PerCP-Cy5.5 (clone IA6-2; BD Biosciences, San Diego, CA)
- IgM-FITC (clone G-20-127; BD Biosciences, San Diego, CA)

6 Metody

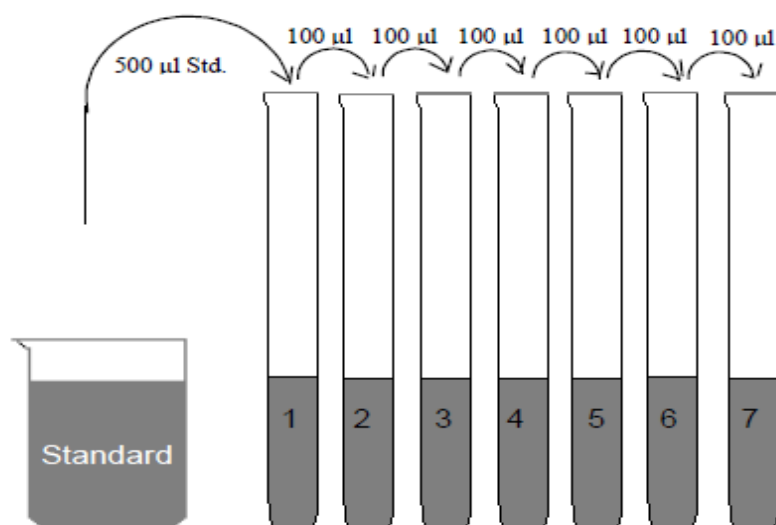
6.1 Měření solubilního BAFF

Pro měření koncentrace solubilního BAFFu byla využita komerčně vyráběná souprava Luminex® Performance Assay – Human Biomarker Base Kit A, R&D Systems.

Séra pacientů byla nejprve rozmrazena a centrifugována (10 minut, 13000 g). Poté byla naředěna. Do každé z připravených zkumavek bylo přeneseno 50 μ l čistého supernatantu a 100 μ l Calibrator Diulent RD6-60.

Příprava reagensí:

Koncentrovaný promývací pufr (20 ml) byl naředěn destilovanou vodou (480 ml). Dále bylo připraveno 7 standardů. Standard Cocktail (prášek) byl rozpuštěn v 1 ml Calibrator Diulent RD6-60. Do první zkumavky bylo přeneseno 500 μ l takto naředěného standardu, do zbylých šesti zkumavek bylo pipetováno 200 μ l Calibrator Diulent RD6-60. Dále byla použita trojitá ředící řada, bylo přeneseno vždy 100 μ l z předchozí do následující zkumavky (viz Obr. 9).



Obr. 9: Schematické znázornění přípravy standardů. (Převzato a upraveno z manuálu Human Biomarker Base Kit A, R&D Systems).

Mikropartikelule s navázanou protilátkou proti BAFFu byly před užitím centrifugovány (30 s 1000 g), protřepány a naředěny (50 μ l mikroparticulí a 5 ml Diluent RD2-5 na 96 jamek).

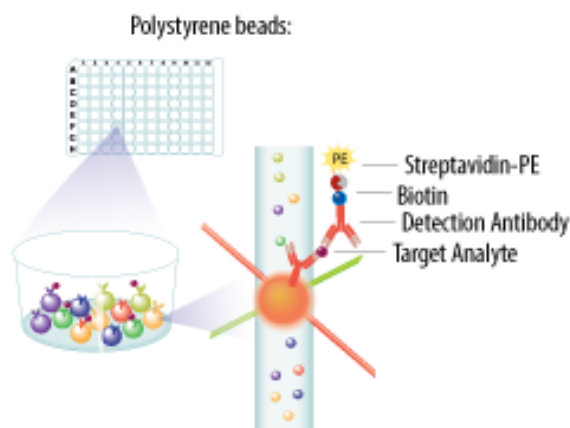
Biotin s navázanou protilátkou byl centrifugován (30 s, při 1000x g), jemně protřepán a zředěn roztokem RD2-5 (50 μ l protilátky a 5 ml Diluent RD2-5).

Streptavidin-PE byl centrifugován (30 s, při 1000x g), jemně protřepán a zředěn (55 μ l Streptavidin-PE a 5,5 ml promývacího pufru). Zkumavka s naředěným streptavidinem byla uschována ve tmě při teplotě 2-8°C.

Provedení testu:

Práce byla provedena v 96 jamkové destičce, která byla předem navlhčena promývacím pufrům (100 μ l/ jamka). Tekutina byla odstraněna rychlým vyklepnutím a odsátím na filtračním papíře. Poté bylo pipetováno do první jamky destičky 50 μ l blanku (Calibrator Diluent RD6-60). Do dalších jamek 50 μ l standardů respektive vzorků. Po přidání 50 μ l mikropartikulí s navázanou protilátkou do každé jamky byla destička zakryta folií a za mírného třepání se 3 hodny inkubovala při laboratorní teplotě.

Po inkubaci byla destička 3x promyta přidáním 100 μ l promývacího roztoku do každé jamky. Mezi jednotlivými kroky promývání byla destička vždy centrifugována 5 minut při 1300 g. Tekutina z destičky byla odstraněna krátkým a ostrým vyklepnutím a odsátím na filtračním papíře.



Obr. 10: Princip metody Luminex

Vzorek se přidá do směsi barevných polystyrenových kuliček, předem potažených protilátkami, které zachycují detekovaný analyt. Přidá se biotinová detekční protilátka specifická pro analyt a tímto se vytvoří „sendvič“ protilátka -antigen. Je přidán Streptavidin-PE, který se váže na biotin. Polystyrenové kuličky jsou detekovány pomocí dvou laserů. První laser rozeznává polystyrenovou kuličku a určuje analyt, který je detekován. Druhý laser určuje velikost signálu PE, který je v přímé úměře k množství vázaného analytu. (Převzato a upraveno z Technical Resources, Příručky R&D Systems)

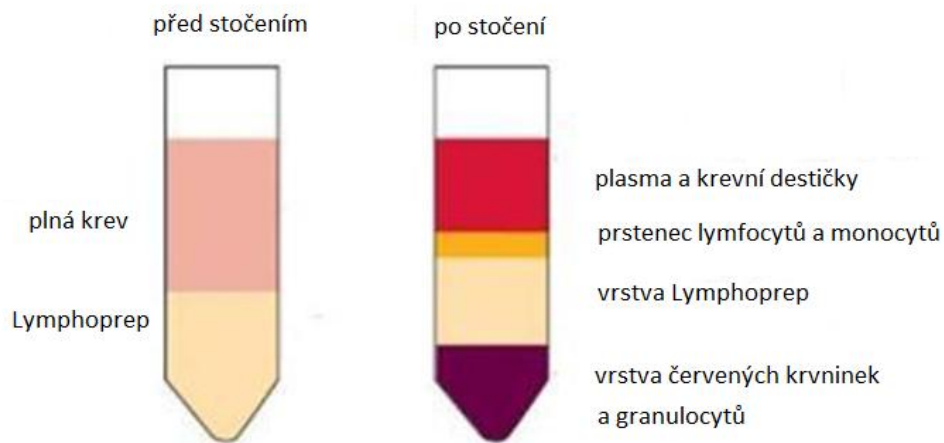
Dále bylo do každé jamky pipetováno 50 μ l naředěného biotinu s navázanou protilátkou. Destička byla opět zakryta folií a inkubována 1 hodinu za mírného třepání a následně 3x promyta viz výše.

Po přidání 50 μ l naředěného Streptavidin-PE a 30 minutové inkubaci na třepačce byla destička 3x promyta.

V posledním kroku byly mikropartikule resuspendovány ve 100 μ l promývacího pufru a po dvou minutách mírného třepání připraveny k analýze na přístroji Luminex 200.

6.2 Izolace mononukleárních buněk z periferní krve

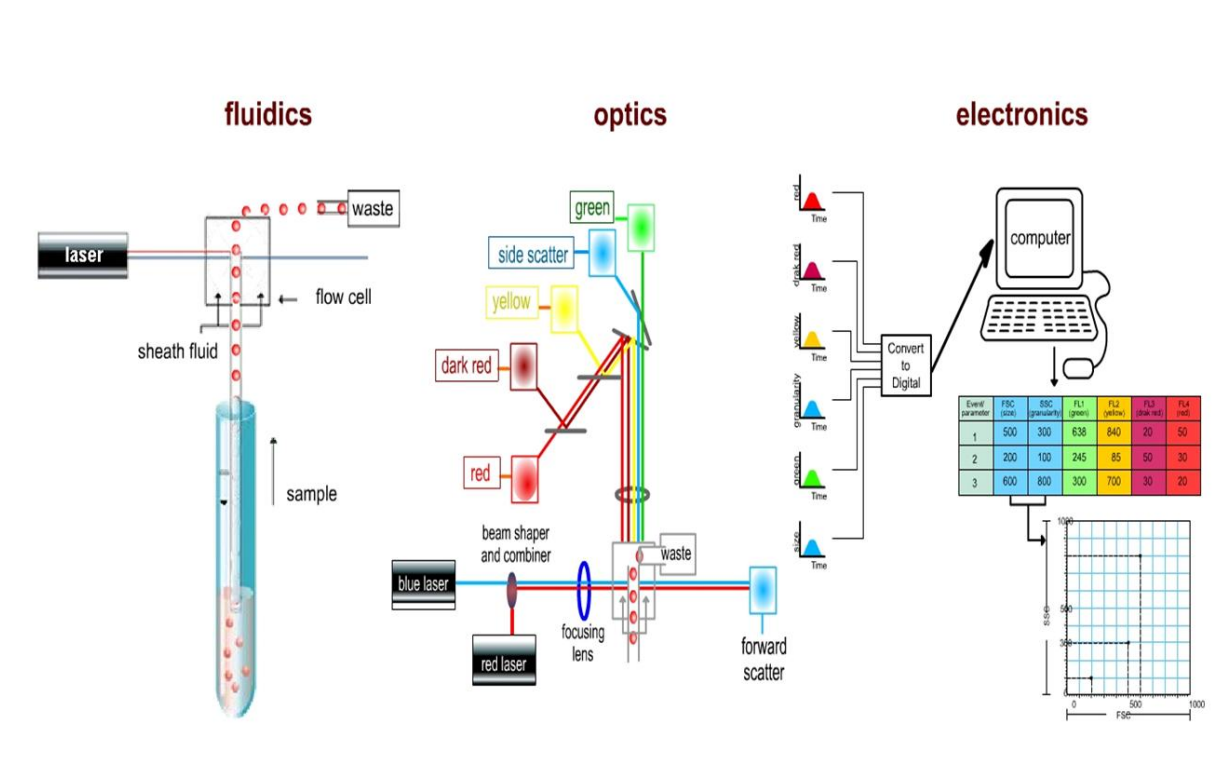
Před měřením na průtokové cytometru bylo třeba izolovat mononukleární buňky z krve. Krev z periferie byla odebrána do zkumavek s EDTA, poté naředěna v poměru 1:1 v PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a opatrně promíchána. Vrstva Lymphoprepu ve zkumavkách Falconn byla převrstvena v poměru 1:2 naředěnou krví. Krev byla kapána pomalu po stěně zkumavky, aby nedocházelo k promíchání jednotlivých vrstev. Vzorky byly centrifugovány (30 minut, 1800 otáček/min, nejnižší stupeň zrychlení a brzdění). Krev se rozdělila pomocí hustotního gradientu (viz Obr. 11) na jednotlivé buněčné složky. Pomocí Pasteurovy pipety byl odebrán prstenec, který vznikl na rozhraní Lymphoprepu a plazmy, a přenesen do čisté zkumavky. Poté byly buňky za pomoci centrifugace promyty dvakrát v PBS (10 minut při 1200 otáčkách, nejnižší stupeň zrychlení, nejvyšší stupeň brzdění). Po odstranění supernatantu byla suspenze buněk naředěna pomocí kultivačního média na koncentraci 1×10^6 buněk/ml. Dále byly buňky značeny monoklonálními protilátkami. Ke 100 μ l suspenze buněk bylo přidáno 10 μ l CD45-KromeOrange, CD19-ECD, CD27-PC7, CD21-PacificBlue, CD38-APC-AF750, CD24-APC, 20 μ l IgM-FITC a 5 μ l IgD-PerCP-Cy5.5 a CD257-PE. Suspenze buněk byla s monoklonálními protilátkami inkubována dvacet minut a poté zastavena roztokem CellWash (BD Biosciences, San Diego, CA). Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru Cyan ADP 9C a hodnoceny systémem Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA).



Obr. 11: Izolace buněk na základě hustotního gradientu (upraveno dle Anonym, 2013)

6.3 Průtoková cytometrie

Pro analýzu jednotlivých subpopulací B lymfocytů byl využit průtokový cytometr Cyan ADP 9C (3 lasery, 9 barev).

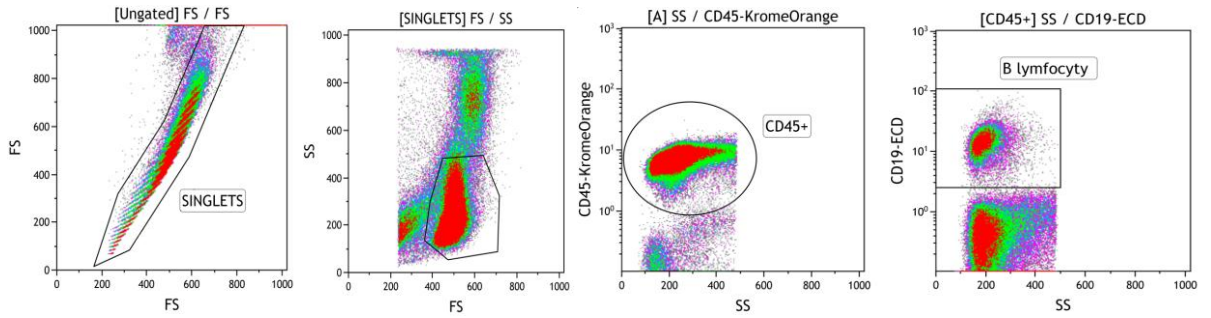


Obr. 12: Princip průtokové cytometrie (Převzato z K. Souček a R. Fedr, Biofyzikální ústav AV ČR, Masarykova Univerzita, FNUSA-ICRC, Průtoková cytometrie a sorting)

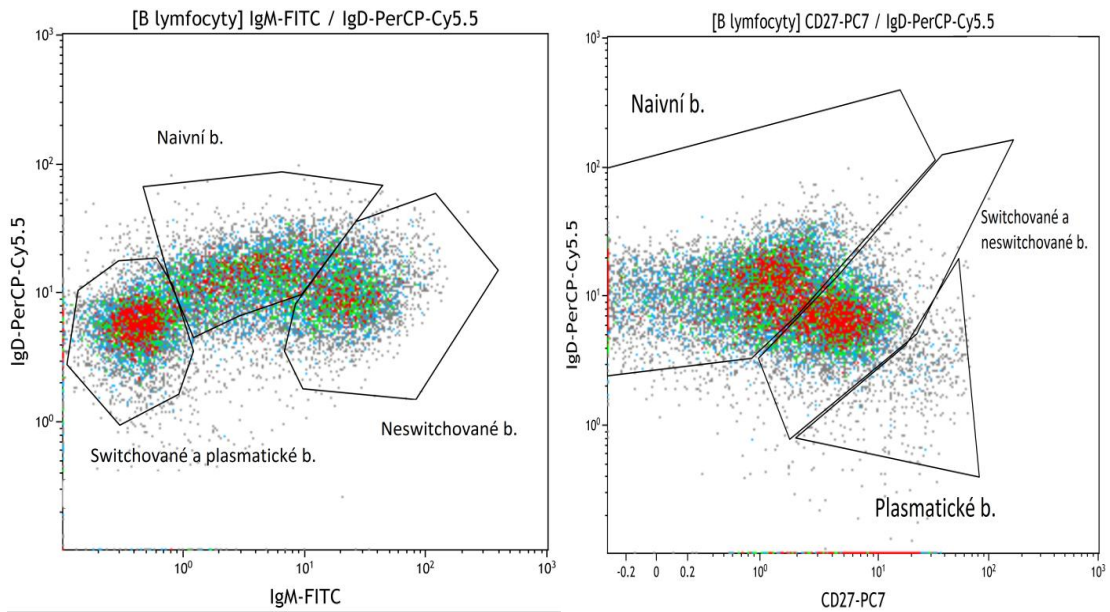
Jedná se o standardní metodu, která slouží k analýze buněk v suspenzi. Buněčná suspenze se značí pomocí monoklonálních protilátek s navázanou fluorescenční značkou (fluorochromem). Molekuly protilátek se specificky vážou na antigeny uvnitř či na povrchu buněk. Suspenze značených buněk je v průtokovém cytometru přtlakem stříkána skrz trysku. Vytvoří se tenký proud suspenze, v němž jsou buňky řazeny za sebou (fluidní systém). Tento proud buněk následně prochází optickým systémem, kde je protínán laserovým paprskem. Z bočního odrazu světla posuzujeme granularitu buněk (SS, side scatter). Čím více dochází k odrazu světla od buňky, tím obsahuje více granulí. Z přímého rozptylu (lomu) světla určujeme velikost buňky (FS, forward scatter). Větší buňky rozptylují světlo více. Pokud došlo k navázání fluorescenční značky, dojde díky použitému laseru k excitaci světla. Paprsky excitovaného světla jsou vedeny na detektory. Elektronický systém pak převádí optický signál z detektorů na elektrický a zároveň ho převede do podoby pro počítačovou analýzu (Bartůňková, 2005).

6.3.1 Gatovací strategie pro stanovení lidských periferních B lymfocytů

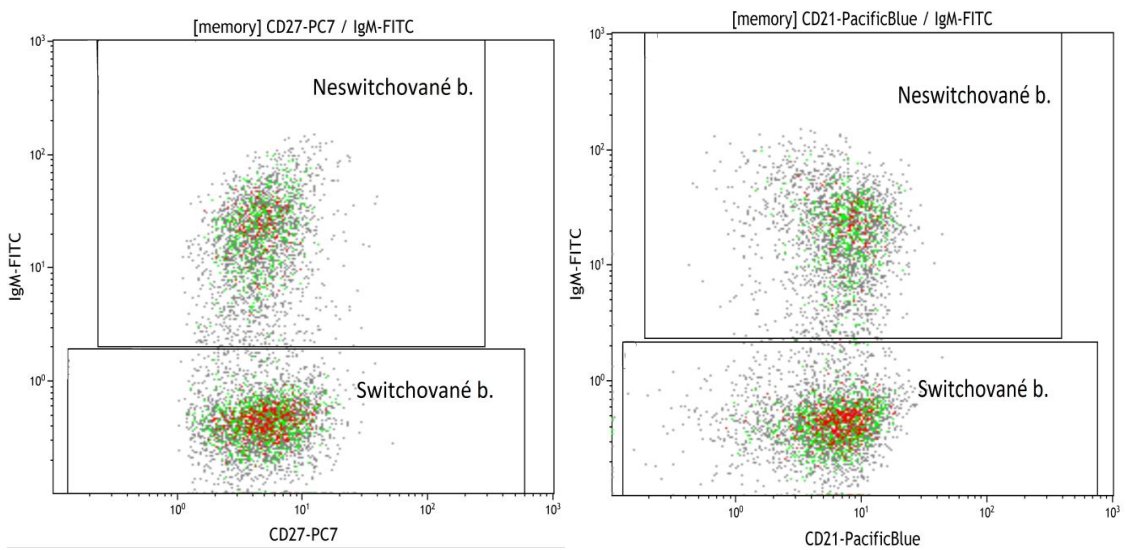
a)



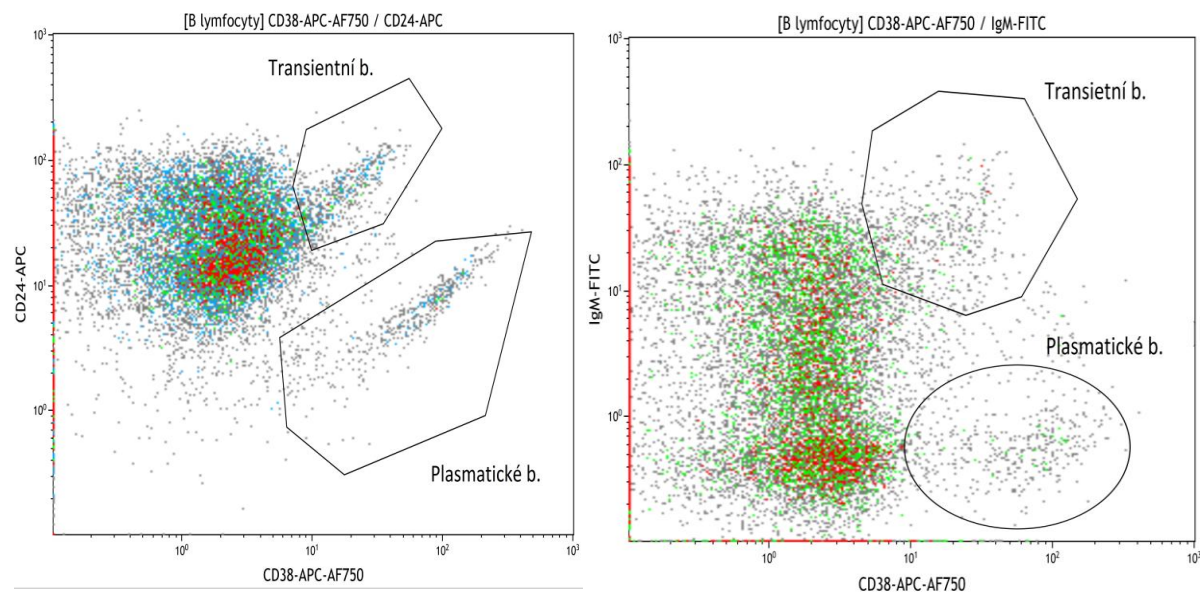
b)



c)



d)



Obr. 13: Gatovací strategie pro stanovení lidských periferních B lymfocytů

a) Definice B lymfocytů pomocí znaku CD45/FS/SS/CD19 b) Stanovení maturovaných naivních buněk ($IgM^+ IgD^+ CD27^-$) c) Paměťové buňky jsou definovány pomocí exprese $IgM^- CD27^+$. Dále byly rozděleny subpopulace B lymfocytů na $IgM^- CD21^+$ nebo $IgM^- CD27^+$ (switchované paměťové B buňky) a $IgM^+ CD27^+$ nebo $IgM^+ CD21^+$ (neswitchované B buňky) d) transientní B buňky jsou určeny jako $CD24^{high} CD38^{high}$ tato subpopulace koresponduje se subpopulací $IgM^{high} CD38^{high}$ plasmablasty Plasmablasty jsou ovšem $IgM^- CD38^{high}$ B buňky nebo $CD24^- CD38^{high}$ B buňky (Švachová et al., 2016)

	transientní	neswitchované	switchované	paměťové	plasmatické
IgM	+++	+++	-	-	-
IgD	+	+	+++	-	-
CD21	-	+++	+	+	-
CD24	+++	+++	-	++	-
CD27	-	+	-	+	+++
CD38	+++	-	+	+	++++
CD45	+++	+++	+++	+++	+++
CD19	+++	+++	+++	+++	+

Tabulka 3: Definice jednotlivých subpopulací B lymfocytů

6.4 Statistické zpracování dat

Při statistickém vyhodnocení byly výsledky zpracovány v programu Graphpad InStat 5.

U obou experimentů byla data analyzována pomocí Mann-Whitneyova testu (věk, BAFF cytokin a počet neshod v HLA antigenech), χ^2 -testu a (pohlaví, přítomnost PRA a DSA, počet transplantací, indukční a udržovací imunosuprese). V případě menšího počtu hodnot byla použita χ^2 -test s Yatesovou korekcí. Výsledky jsou uvedené jako průměr \pm směrodatná odchylka nebo procento. Rozdíly mezi daty jsou statisticky významné, pokud p hodnota $< 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

7 Výsledky

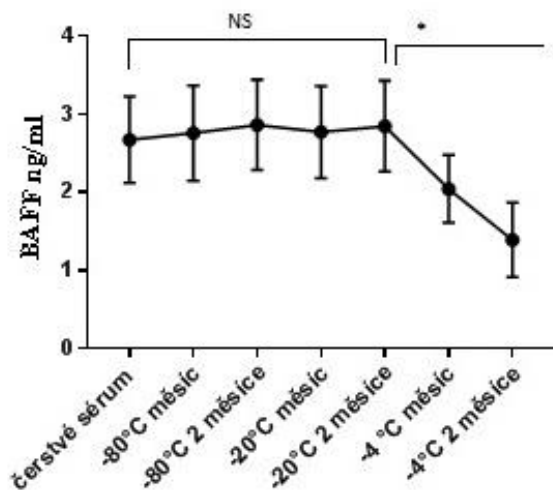
7.1 Stabilita solubilního cytokinu BAFF

Proteiny při nevhodném skladování mohou degradovat. Proto jsme provedli zkoušku zjistit stabilitu BAFF cytokinu za různých podmínek. Byly použity vzorky od tří pacientů před transplantací a koncentrace BAFF ihned po odběru a po skladování při 4°C, -20°C a -80°C byly určeny metodou Luminex. Výsledky jsou prezentovány v Tabulce č. 4 a obrázku 14.

Pacient	BAFF (ng/ml)						
	Čerstvé sérum	-80°C 1. měsíc	-80°C 2. měsíc	-20°C 1. měsíc	-20°C 2. měsíc	4 °C 1. měsíc	4 °C 2. měsíc
1	2,930	3,105	3,115	3,005	3,100	2,230	1,749
2	2,040	2,055	2,200	2,101	2,182	1,548	0,848
3	3,049	3,111	3,274	3,204	3,258	2,349	1,568

Tabulka 4: Stabilita BAFF cytokinu

Koncentrace BAFF při -80°C a -20°C byly téměř totožné s čerstvým sérem (NS). Výrazný pokles koncentrace BAFF byl pozorován při uchování v lednici při teplotě -4°C už v prvním měsíci, tento pokles byl statisticky významný (Mann-Whitney test (* $p < 0,05$)).



Obr. 14: Vývoj stability BAFF při různých teplotách v čase

7.2 Experiment 1 – solubilní BAFF (sBAFF)

Z celkového počtu 92 pacientů v první skupině, 13 pacientů mělo akutní humorální rejekci, 18 pacientů bylo diagnostikováno s akutní celulární rejekcí a 4 pacienti vyvinuli současně akutní humorální a celulární rejekci. U jednoho pacienta byla diagnostikována chronická humorální rejekce. U zbývajících 60 pacientů, žádná rejekce nebyla diagnostikována. Do studie byli zařazeni dva pacienti s ledvinou od živého dárce, zbylých 90 pacientů získalo ledvinu od zemřelého dárce. Antithymocytární globulin (ATG) a kortikosteroidy byly použity jako indukční imunosuprese u 13 pacientů, Tabulka 5. Udržovací léčba (takrolimus, mykofenolát mofetil, kortikoidy) byla aplikována všem pacientům.

7.2.1 Demografické údaje a klinická data příjemců ledviny a výskyt akutní humorální rejekce

Průměrný věk skupiny s akutní humorální rejekcí byl 52±12 let, pacienti bez rejekce měli průměrný věk 54±11 let (NS). Do této skupiny byli i zařazeni 4 pacienti, u kterých byla diagnostikována současně AMR + ACR. Opakovaná transplantace proběhla u 4 pacientů. Indukční imunosuprese byla aplikována u 5 pacientů, i přes to, všichni tito pacienti měli diagnostikovanou akutní humorální rejekci v průběhu po transplantaci. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi pohlavím, věkem, typem dárce a dalšími demografickými parametry u pacientů s rejekcí a bez rejekce (Tabulka 5). Ke ztrátě funkce štěpu z imunologických příčin došlo u 6 pacientů s akutní humorální rejekcí.

		Bez rejekce		AMR		P hodnota
		n=60	Interval/[%]	n=13	Interval/[%]	
Věk		57±12	(19-76)	52±12	(33-66)	NS
Pohlaví příjemce	Muž (n=44)	39	89%	5	11%	NS
	Žena (n=29)	21	73%	8	27%	NS
Dárce	Živý (1)	1	100%	0	0%	NS
	Zemřelý (72)	59	82%	13	18%	NS
Transplantace	První (n=69)	57	83%	12	17%	NS
	Retransplantace (n=4)	3	75%	1	25%	NS
Indukční imunosuprese (ATG, kortikosteroidy)	ano (n=13)	8	62%	5	38%	NS
	ne (n=60)	52	87%	8	13%	NS

Tabulka 5: Demografické údaje u pacientů s akutní humorální rejekcí a bez rejekce. AMR-akutní humorální rejekce, ATG-Antithymocytární globulin

7.2.2 Vybrané rizikové faktory ve vztahu k akutní humorální rejekci

Počet HLA neshod se pohyboval od 0 po maximálně 6 neshod (v lokusech A, B a DR) a signifikantně se nelišil u pacientů s rejekcí a bezrejekce. Koncentrace panel reaktivních protilátek rovněž nebyla zvýšená u pacientů s AMR (Tabulka 6).

		Bez rejekce		AMR		P hodnota
		n=60	Interval/[%]	n=13	Interval/[%]	
Neshody v HLA	A, B	3±1,2	(0-4)	3±0,7	(0-4)	NS
	DR	1±0,7	(0-2)	1±0,8	(0-1)	NS
	A, B, DR<4 (n=45)	42	94%	3	6%	NS
	A, B, DR ≥ 4(n=27)	18	67%	9	33%	
PRA	< 10 % (n=61)	53	87%	8	13%	NS
	≥ 10 % (n=12)	7	58%	5	42%	
	<50% (n=67)	56	82%	11	17%	NS
	≥50% (n=6)	4	67%	2	33%	

Tabulka 6: Vybrané rizikové faktory ve vztahu k akutní humorální rejekci, PRA-Panel reaktivní protilátky, AMR-akutní humorální rejekce

7.2.3 Demografické údaje a klinická data příjemců ledviny a výskyt souběžné celulární a protilátkami-zprostředkované rejekce

Čtyři pacienti s AMR (2 muži a 3 ženy) měli diagnostikovanou současně probíhající akutní celulární rejekci (ACR). Jeden pacient měl před transplantací indukční imunosupresi, udržovací imunosuprese byla podávána všem pacientům. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi věkem, pohlavím příjemce, typem dárce, počtem transplantací ani typem imunosuprese u pacientů s AMR + ACR a pacienty bez rejekce (Tabulka 7).

		Bez rejekce		AMR + ACR		P hodnota
		n=60	Interval/[%]	n=4	Interval/[%]	
Věk		57±12	(19-76)	48±8	(42-66)	NS
Pohlaví příjemce	Muž (n=41)	39	95%	2	5%	NS
	Žena (n=23)	21	91%	2	9%	NS
Dárce	Živý (1)	1	100%	0	0%	NS
	Zemřelý (63)	59	94%	4	6%	NS
Transplantace	První (n=61)	57	93%	4	7%	NS
	Retransplantace(n=3)	3	100%	0	0%	NS
Indukční imunosuprese (ATG, kortikosteroidy)	ano (n=9)	8	88%	1	11%	NS
	ne (n=55)	52	94%	3	6%	NS

Tabulka 7: Demografické údaje a klinická data příjemců ledviny a výskyt kombinované ACR a AMR. AMR-akutní humorální rejekce, ACR-akutní celulární rejekce, ATG- Antithymocytární globulin

7.2.4 Vybrané rizikové faktory ve vztahu k současně probíhající ACR a AMR

Nepozorovali jsme žádný rozdíl u pacientů s ACR+AMR oproti pacientům bez rejekce a s ojedinělou AMR. Nebyla prokázána souvislost mezi panel reaktivními protilátkami diagnostikovanými před transplantací a rozvojem současné ACR+AMR (Tabulka 8).

		Bez rejekce		AMR + ACR		AMR		P hodnota
		n=60	Interval/[%]]	n=4	Interval/[%]	n=9	Interval/[%]	
Neshody v HLA	A, B	3±1,2	(0-4)	3±0,8	(2-4)	3±0,9	(2-4)	NS
	DR	1±0,7	(0-2)	1±1	(0-2)	1±0,6	(0-2)	NS
	A, B, DR<4 (n=46)	42	94%	0	0%	4	100%	NS
	A, B, DR ≥ 4 (n=27)	18	67%	4	15%	5	19%	NS
PRA	< 10 % (n=60)	53	87%	4	7%	3	5%	NS
	≥ 10 % (n=13)	7	53%	0	0%	6	46%	
	<50% (n=67)	56	82%	4	6%	7	10%	NS
	≥50% (n=6)	4	67%	0	0%	2	33%	

Tabulka 8: Vybrané rizikové faktory ve vztahu k ACR+AMR, PRA-Panel reaktivní protilátky, AMR-Akutní humorální rejekce, ACR-akutní celulární rejekce

7.2.5 Demografické údaje a výskyt ACR

Mezi pacienty s ACR jeden příjemce získal ledvinu od živého dárce, ostatní ledviny byly od zemřelých dárců. Všichni pacienti s ACR podstoupili první transplantaci. Ke ztrátě funkce štěpu došlo ve třech případech. 11 pacientů bylo léčeno ATG a kortikosteroidy (indukční imunoprese) (Tabulka 9).

		Bez rejekce		ACR		P hodnota
		n=60	Interval/[%]	n=18	Interval/[%]	
Věk		55	(19-76)	57	(41-66)	NS
Pohlaví příjemce	Muž (n=52)	39	75%	13	25%	NS
	Žena (n=26)	21	81%	5	19%	NS
Dárce	Živý (1)	1	100%	0	0%	NS
	Zemřelý (77)	59	77%	18	23%	NS
Transplantace	První (n=75)	57	76%	18	24%	NS
	Retransplantace (n=3)	3	100%	0	0%	NS
Indukční imunoprese (ATG, kortikosteroidy)	ano (n=19)	8	42%	11	58%	NS
	ne (n=59)	52	88%	7	12%	NS

Tabulka 9: Vybrané rizikové faktory ve vztahu s akutní humorální rejekcí, ACR-akutní celulární rejekce, ATG-Antithymocytární globulin

7.2.6 Vybrané rizikové faktory ve vztahu k výskytu ACR

Maximální počet neshod v HLA systému mezi dárcem a příjemcem byl 6 a signifikantně se nelišil u pacientů s ACR a pacientů bez rejekce. Rovněž koncentrace panel reaktivních protilátek nebyla rizikovým faktorem pro vývoj ACR (Tabulka 10).

		Bez rejekce		ACR		P hodnota
		n=60	Interval/[%]	n=18	Interval/[%]	
Neshody v HLA	A, B	3±1,2	(0-4)	3±0,8	(2-4)	NS
	DR	1±0,7	(0-2)	1±0,6	(0-2)	NS
	A, B, DR<4 (n=55)	42	76%	13	24%	NS
	A, B, DR ≥ 4(n=23)	18	78%	5	22%	NS
PRA	< 10 % (n=69)	53	77%	16	23%	NS
	≥ 10 % (n=9)	7	78%	2	22%	
	<50% (n=67)	56	84%	18	84%	NS
	≥50% (n=6)	4	10%	0	0%	

Tabulka 10: Vybrané rizikové faktory ve vztahu k ACR, PRA-Panel reaktivní protilátky, ACR-akutní celulární rejekce

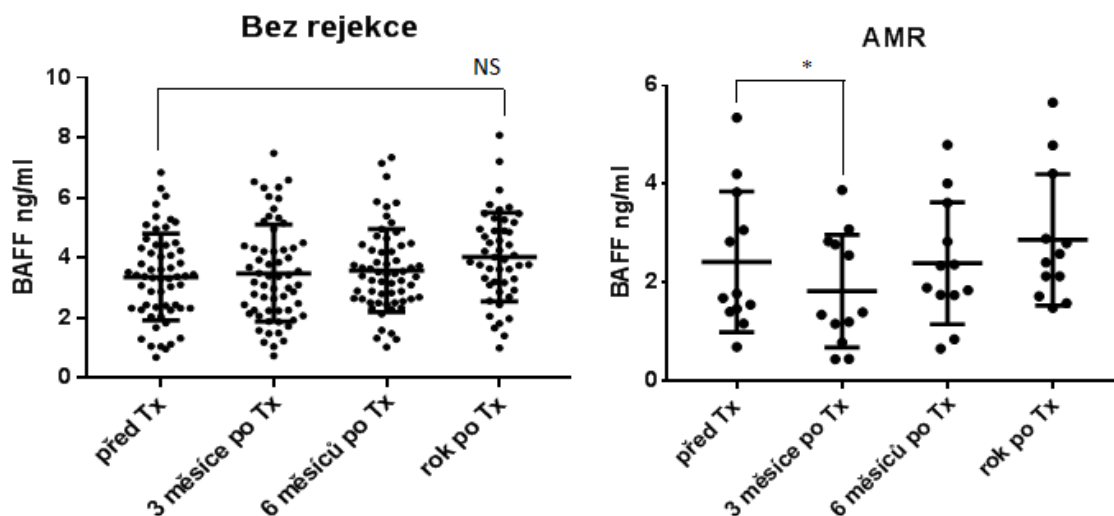
7.2.7 Koncentrace sBAFF ve vztahu k AMR

AMR byla diagnostikována u pacientů týden až tři měsíce po transplantaci. Pacienti bez AMR měli před i po transplantaci stejné hladiny sBAFF (Obr. 15). Rovněž před transplantací pacienti s AMR nevykazovali významné rozdíly v hladinách sBAFF v porovnání s pacienty bez rejekce. Po transplantaci ale pacienti s AMR měli signifikantní pokles sBAFF, který byl významný i po celý čas sledování (jeden rok). Největší rozdíl v koncentracích sBAFF byl 3 měsíce po Tx ($p < 0,001$) (Tabulka 11).

		Bez rejekce		AMR		P hodnota
BAFF (ng/ml)	před Tx (n=69)	3,4±1,4	(0,6-6,8)	2,4±1,3	(0,6-5,3)	NS
	3m po Tx (n=69)	3,5±1,5	(0,7-7,6)	***1,8±1,1	(0,4-3,8)	<0,001
	6m po Tx (n=69)	3,6±1,4	(1,4-7,1)	*2,34±1,2	(0,6-4,7)	<0,05
	rok po Tx (n=69)	4,0±1,5	(1,4-7,2)	*2,8±1,3	(1,4-5,6)	<0,05

Tabulka 11: Koncetrace sBAFF u pacientů bez rejekce a s AMR

Hodnoceno Mann-Whitneyův testem, *, ***vztaženo ke skupině bez rejekce



Obr. 15: Vývoj koncentrace sBAFF cytokinu v čase u pacientů bez rejekce a s AMR

Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem, (* $p < 0,05$)

Dva pacienti byli hodnoceni zvlášť (mimo analyzovaný soubor). U prvního pacienta byla po 14 měsících diagnostikována chronická humorální rejekce. Už po 12 měsících byl pozorován pokles koncentrace sBAFF. U druhého pacienta proběhla AMR 3 měsíce po transplantaci. I zde došlo k výraznému poklesu koncentrace sBAFF. Pacient byl léčen monoklonální protilátkou proti CD20 (Rituximab). Výrazně zvýšenou koncentraci BAFF můžeme pozorovat 6 měsíců po transplantaci (důvodem byla léčba touto monoklonální protilátkou, (Zahrkin et al., 2009), (Tabulka 12).

	BAFF před Tx (ng/ml)	BAFF 3 měsíce po Tx (ng/ml)	BAFF 6 měsíců po Tx (ng/ml)	BAFF rok po Tx (ng/ml)
Pacient č. 1	3,032	4,008	3,157	2,469
Pacient č. 2.	2,088	0,712	6,314	7,166

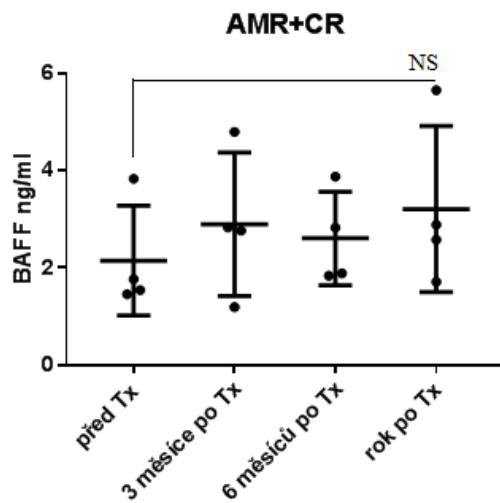
Tabulka 12: Koncetrace BAFF u pacientů, kteří byli hodnoceni mimo analyzovaný soubor.

7.2.8 Koncentrace sBAFF ve vztahu k současně probíhající ACR a AMR

Neshledali jsme žádný signifikantní rozdíl v hladinách BAFF u pacientů s ACR+AMR ve srovnáním s pacienty bez rejekce a pacienty jen s AMR (Tabulka 13) a (Obr.16).

		Bez rejekce		AMR		AMR + CR		P hodnota
BAFF (ng/ml)	před Tx (n=73)	3,4±1,4	(0,6-6,8)	2,5±1,5	(0,7-5,3)	2,2±0,9	(1,4-3,8)	NS
	3m po Tx (n=73)	3,5±1,5	(0,7-7,6)	1,4±1,2	(0,4-3,1)	2,8±1,2	(1,1-4,8)	NS
	6m po Tx (n=73)	3,6±1,4	(1,4-7,1)	2,2±1,1	(0,6-4,0)	2,6±0,8	(1,9-3,9)	NS
	rok po Tx (n=73)	4,0±1,5	(1,4-7,2)	2,7±1,1	(1,4-4,7)	3,2±1,4	(1,7-5,7)	NS

Tabulka 13: Koncentrace s BAFF u pacientů s ACR+AMR



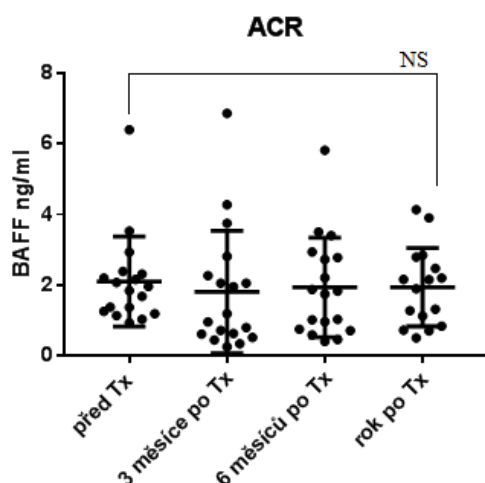
Obr. 16: Vývoj koncentrace sBAFF v čase u pacientů se současně probíhající ACR a AMR
Hodnoceno Mann-Whitney testem, NS

7.2.9 Koncentrace sBAFF ve vztahu k ACR

Pacienti s ACR měli před i po transplantaci signifikantně nižší hladiny sBAFF než pacienti bez rejekce (Tabulka 14). Na rozdíl však od pacientů s AMR byly u pacientů s ACR hladiny sBAFF v různých intervalech po transplantaci i v době rejekce přibližně stejné (Obr.17).

		Bez rejekce		ACR		P hodnota
BAFF (ng/ml)	před Tx (n=69)	3,4±1,4	(0,6-6,8)	2,1±1,2	(0,9-6,4)	< 0,05
	3m po Tx (n=69)	3,5±1,5	(0,7-7,6)	1,8±1,6	(0,2-6,8)	<0,01
	6m po Tx (n=69)	3,6±1,4	(1,4-7,1)	1,9±1,3	(0,4-6,8)	<0,01
	rok po Tx (n=69)	4,0±1,5	(1,4-7,2)	2,8±1,3	(0,4-4,1)	< 0,05

Tabulka 14: Koncetrace s BAFF u pacientů s ACR.



Obr. 17: Vývoj koncentrace sBAFF cytokinu v čase u pacientů s ACR
Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem, NS

7.3 Experiment 2 – membránově vázaný BAFF

V naší studii jsme porovnávali hladiny solubilního a membránově vázaného BAFF na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů. Do analýzy bylo zahrnuto 20 pacientů ve věkovém rozmezí 23-70 let, u kterých proběhla transplantace ledvin v roce 2016.

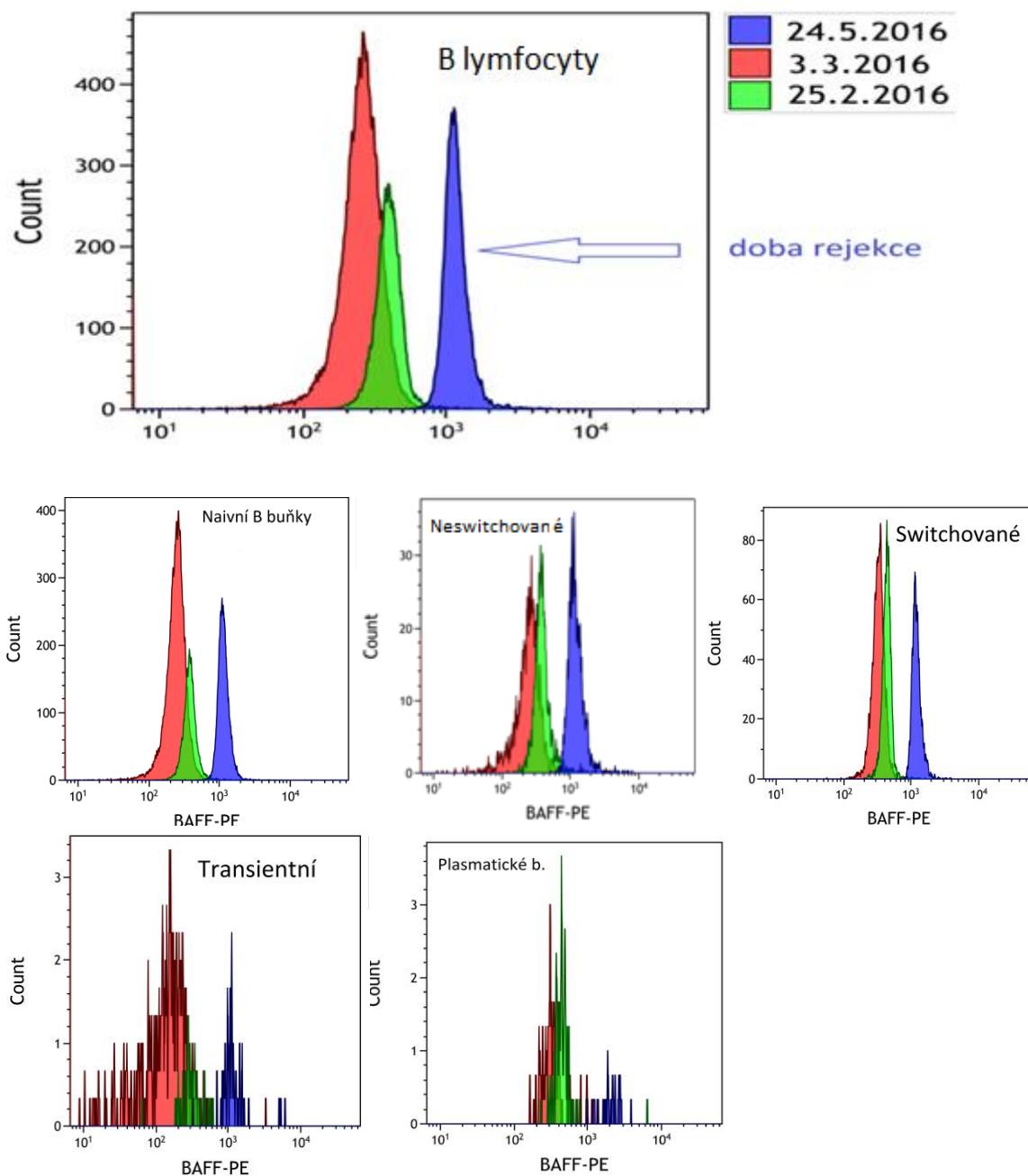
AMR měli 4 pacienti a 2 pacienti měli diagnostikovanou ACR (pro malý vzorek pacientů nelze hodnotit). Za sledované období (3 měsíce) 14 pacientů bylo bez rejekce. Nejčastěji používanou indukční léčbou bylo ATG a to v 9 případech, ve 3 případech byly aplikovány intravenózní imunoglobuliny (IVIG) a jednou byla provedena plasmaferéza

(odstranění IgG z krve pacienta a jejich nahrazení IVIG na dialyzačním oddělení). Protilátka proti IL-2 receptoru (Basiliximab) byla použita třikrát a jednou byl aplikován alemtuzumab (protilátka proti antigenu CD52). U pěti pacientů byla biopticky diagnostikována v transplantované ledvině akutní tubulární nekróza, jeden z těchto 5 pacientů měl zároveň AMR.

Koncentrace solubilního BAFF byla u pacientů s AMR před transplantací $1,4 \pm 0,4$ ng/ml, týden po transplantaci klesla na **$0,88 \pm 0,3$** ng/ml a 3 měsíce po transplantaci se zvýšila na $1,77 \pm 0,4$ ng/ml. U pacientů, u kterých rejekce neproběhla, hladina sBAFF byla před transplantací $1,45 \pm 0,8$ ng/ml, týden po transplantaci $1,32 \pm 0,8$ ng/ml a 3 měsíce po transplantaci $1,7 \pm 1,6$ ng/ml.

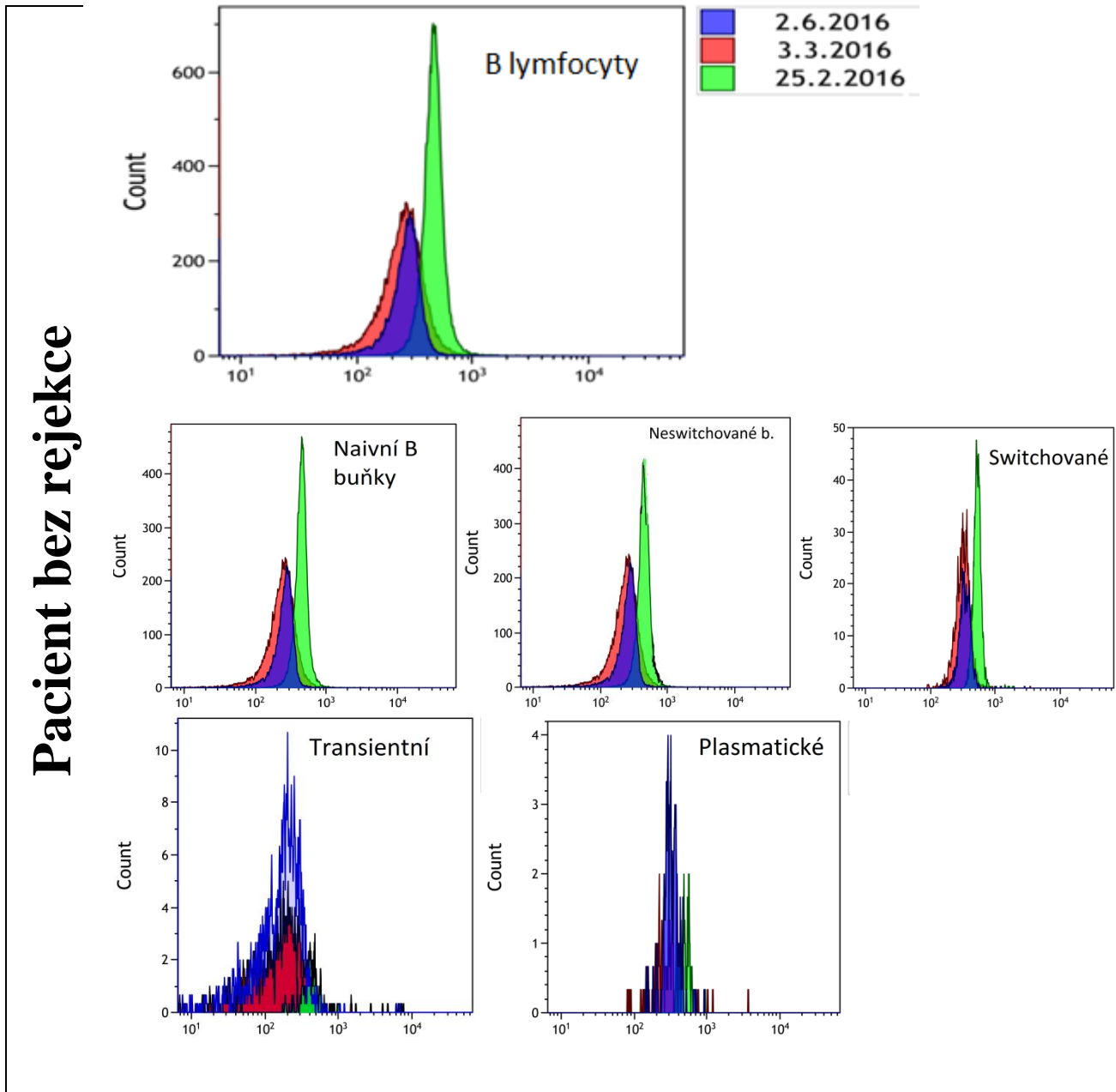
Pacient s akutní humorální rejekcí

Na Obr. č. 18 je ukázáno, že v době rejekce **u jednoho pacienta (40 dnů po Tx)** dochází k významnému nárůstu membránově vázaného BAFF na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů (naivní, neswitchované, switchované, transientní a plasmatické).



Obr. 18: Membránově vázaný BAFF na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů u pacienta s AMR

Na Obr. č. 19 je uvedeno, že u pacienta, u kterého nebyla reжекce, je koncentrace BAFF navázaného na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů v čase stejná.



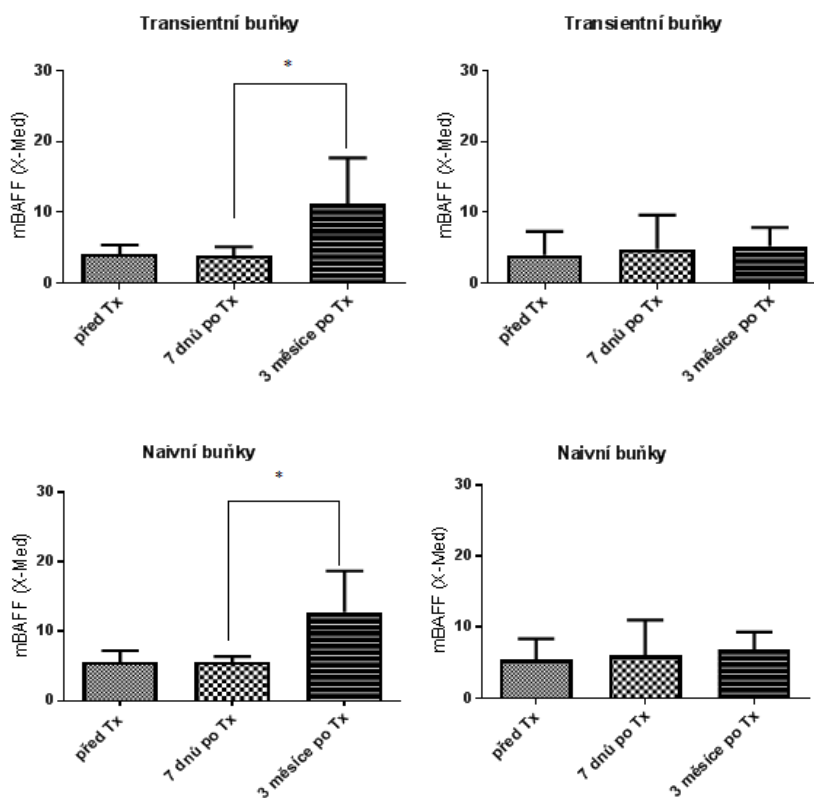
Obr. 19: Membránově vázaný BAFF na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů u pacienta bez reжекce.

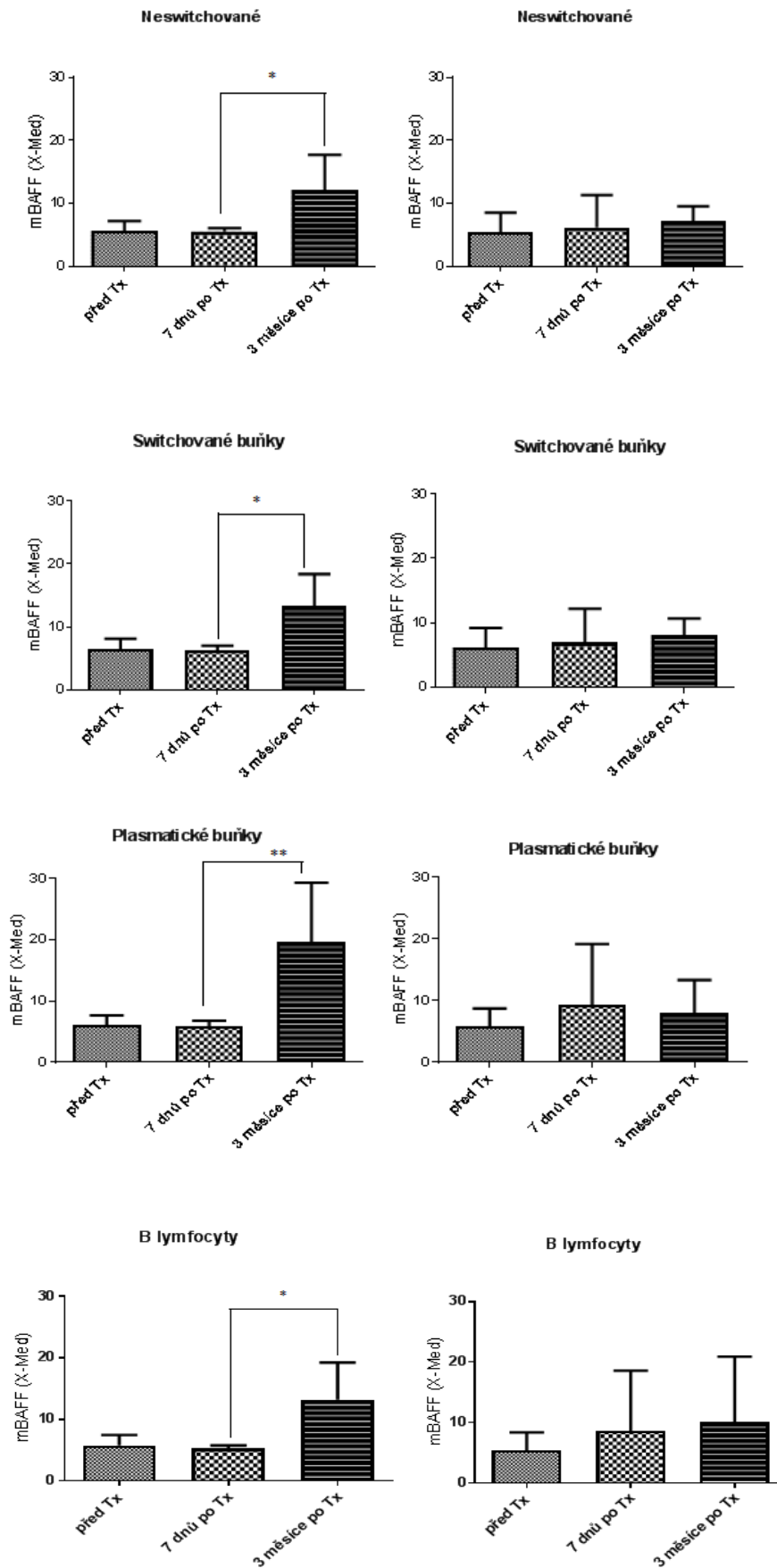
7.3.1 Porovnání membránově vázaného BAFF u pacientů s AMR a bez rejekce na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů

Před transplantací byly koncentrace BAFF navázaného na membránu jednotlivých subpopulací B lymfocytů stejné u pacientů s AMR (X-Med: $5,76 \pm 1,4$) a u pacientů bez rejekce (X-Med: $5,42 \pm 2,8$). U pacientů bez rejekce nedošlo k žádné výrazné změně po celém období sledování (3 měsíce). V době AMR ale došlo k signifikantnímu ($p < 0,05$) nárůstu membránově vázaného BAFF na všech populacích B lymfocytů (X-Med: $13,19 \pm 5,4$). Tento nárůst byl nejvíce výrazný na subpopulaci plasmatických buněk (X-Med: $19,64 \pm 7,63$, $p < 0,01$).

AMR ↓

Bez rejekce ↓





Obr. 20: Srovnání membránově vázaného BAFF na jednotlivých subpopulacích B lymfocytů u pacientů s AMR a bez rejecky, Hodnoceno Mann-Whitney testem, (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

8 Diskuze

Cílem této práce bylo porovnat hladiny sBAFF a vázaného BAFF na B lymfocytech u pacientů s AMR, ACR a pacientů bez rejekce. Měření bylo prováděno před a po transplantaci v daných časových intervalech. Záměrem bylo zjistit, zda by sBAFF či vázaný BAFF na B lymfocytech mohly sloužit jako markery rejekce u pacientů po transplantaci ledviny.

Rejekce obecně je závažnou příčinou dlouhodobého poškození transplantované ledviny a bez adekvátní léčby vede ve většině případů ke ztrátě štěpu. Proto má predikce této komplikace značný klinický význam a je objektem intenzivního zkoumání v mnoha imunologických laboratořích. Hlavní důraz byl v této práci kladen na humorální rejekci protože, jak již bylo popsáno v úvodu, AMR je mnohem závažnější forma rejekce než ACR a je hlavní (imunologickou) příčinou selhání transplantovaných orgánů (Colvin, 2007). Důležitou funkci při vývoji AMR mají B lymfocyty jako producenti protilátek. Kromě toho jsou B lymfocyty i antigen prezentujícími buňkami a proto hrají roli i při vývoji ACR po transplantaci (aktivace T buněk).

Na začátku experimentální práce jsme provedli pokusy, abychom zjistili, zda stabilita BAFF cytokinu, uchovaného dlouhodobě při -20°C je vyhovující. Provedením tohoto předběžného experimentu jsme se ujistili, že uchování vzorků sér při -20°C nenarušuje stabilitu cytokinu a je pro účely experimentální práce v pořádku.

Analýza demografických dat a některých rizikových faktorů vývoje rejekce u pacientů, kteří byli zařazeni do diplomové práce, neprokázaly jejich signifikantní vliv na výskyt jak AMR, tak ACR a kombinované ACR a AMR. To se zvláště týká počtu HLA neshod a zvýšených panel-reaktivních protilátek, které jsou jasným rizikovým faktorem jak ACR, tak AMR (Opelz, 2005). To, že se nepodařilo prokázat vliv PRA na incidenci AMR, bychom mohli vysvětlit poměrně nízkým počtem pacientů s touto komplikací, proto nebylo možné dosáhnout statistické signifikance.

Jak bylo uvedeno v úvodu, literární data o klinické relevanci měření sBAFF vzhledem k predikci AMR se výrazně liší. Na rozdíl od našich výsledků, ve dvou publikacích nebyla potvrzena korelace koncentrace solubilního BAFF s výskytem akutní humorální rejekce (Snanoudj et al., 2014, Thibault-Espitia et al., 2012). V naší studii jsme pozorovali statisticky významný pokles sBAFF v séru pacientů, u kterých došlo k rozvoji AMR. Dá se

proto předpokládat, že solubilní BAFF se váže v době humorální rejekce na své receptory, které se objevují na B lymfocytech. Tudíž nedochází pravděpodobně v době rejekce k syntéze solubilního BAFF „*de novo*“, ale k vyvázání sBAFF, který je již v krvi přítomen. Je pravděpodobné, že k vyvázování sBAFF bude kromě na B lymfocytech docházet také na povrchu T lymfocytů (receptory BAFF-R a TACI), které se rovněž účastní humorální rejekce jako pomocné T lymfocyty (Ng et al., 2004). Práce skupiny z Cambridge uvádí, že zvýšené koncentrace sBAFF by mohly být prediktorem vývoje AMR (Banham G et al., 2013). Tato analýza ale byla provedena na kohortě pacientů, kteří byli transplantováni i přes pozitivitu v křížové zkoušce (crossmatch test), to znamená, že tito pacienti měli preformované donor-specifické protilátky před transplantací. Naše výsledky měření koncentrací sBAFF jsou přímo opačné těmto publikovaným údajům, vysvětlení by bylo to, že náš soubor byl jiný, v ČR se pacienti s preformovanými cytotoxickými protilátkami transplantují zcela vyjimečně (po odstranění protilátek plazmaferézou a aplikaci IVIG).

Pokles solubilního BAFF jsme zaznamenali i u pacienta, u něhož byla zjištěna chronická humorální rejekce. Rejekce byla provázena poklesem solubilního BAFF, což nasvědčuje navázání solubilního BAFF na receptory na povrchu buněk. Naše výsledky jsou v souladu s prací Kreuzalera et al., kteří zjistili, že koncentrace BAFF hlavně závisí na počtu B buněk, stejně jako na expresi BAFF-R na B lymfocytech (Kreuzaler et al., 2012). Nepřímá korelace mezi počtem B lymfocytů a solubilním BAFF byla prokázána i v práci Zarkhina et al. V ní autoři uvádějí, že biologická léčba anti-CD20 protilátkou vede k jejich depleci, čímž zvyšuje koncentraci solubilního BAFF (plazmatické buňky nemají znak CD20 a nejsou proto depletovány) (Zarkhin et al., 2009). V našem souboru, který zahrnoval jednoho pacienta léčeného rituximab, byl pokles sBAFF v době rejekce následován významným nárůstem sBAFF po nasazení biologické léčby. Tyto výsledky naznačují, že sBAFF je z krve vyvazován B lymfocyty, na kterých se po jejich aktivaci zvyšuje koncentrace receptorů pro BAFF. Zatím není známo, na kterých subpopulacích B lymfocytů se objevují které receptory.

Práce Xu et al. naznačuje, že exprese BAFF vázaného na buňkách je u pacientů s abnormální funkcí štěpu signifikantně vyšší ve srovnání s pacienty s normální funkcí transplantované ledviny (Xu et al., 2009). Zároveň touto skupinou bylo uvedeno, že koncentrace vázaného BAFF by mohla korelovat s produkcí HLA-specifických protilátek a mohla by souviset s rejekcí a následnou ztrátou štěpu (Xu et al., 2009). Naše výsledky jsou v souladu s tímto zjištěním. Pacienti, u kterých se rozvinula humorální nebo celulární rejekce,

měli zvýšenou expresi vázaného BAFF na B lymfocytech jako celku i na jednotlivých subpopulacích (transientní, naivní, neswitchované, switchované, paměťové i plazmatické). Nejpatrnější nárůst povrchového BAFF byl zjištěn u plazmatických buněk. Na plazmablastech docházelo v období rejeckce až k trojnásobnému nárůstu vázaného BAFF. Je prokázáno, že BAFF po vazbě na receptor BCMA hraje významnou roli v konečných stádiích B buněčné aktivace a řídí přežití plazmablastů v kostní dřeni (O'Connor et al, 2004, Thompson et al, 2000). Dá se tedy předpokládat, že nárůst vázaného BAFF na povrchu plazmatických buněk hraje významnou úlohu při zvýšení syntézy protilátek. Vzhledem k zjištěním Xu et al. to znamená i zvýšenou syntézu donor-specifických protilátek. Bohužel, z technických důvodů (nedostatečný počet detektorů průtokového cytometru) nebylo možno zjistit, zda narůstá spolu s rostoucí koncentrací vázaného BAFF i exprese receptoru BCMA na plazmablastech. Toto je otázka, kterou je třeba do budoucna zodpovědět.

Ostatní subpopulace B lymfocytů vykazovaly v době rejeckce dvojnásobný nárůst povrchové exprese BAFF. I v těchto případech by bylo velmi zajímavé zjistit, které receptory pro BAFF se objevují na povrchu sledovaných subpopulací. Například, exprese TACI se zvyšuje na povrchu B lymfocytů, pokud jsou aktivovány přes TLR. TACI hraje významnou roli při aktivaci B lymfocytů marginální zóny (neswitchované) (Groom et al., 2007, Katsenelson et al., 2007). Naopak BAFF-R se objevuje na nezralých B lymfocytech (transientních buňkách), které musí projít diferenciací (Mackay et al., 2003). Přežití druhého a třetího stádia transientních buněk je závislé právě na signalizaci mezi BAFF-R a BAFF (Mackay et al., 2009, Batten et al., 2000).

Shrnutí cílů do budoucna:

Jelikož jsme potvrdili, že BAFF se váže na jednotlivé subpopulace B lymfocytů, bylo by zajímavé se v budoucnu zaměřit na jednotlivé receptory (BAFF-R, BCMA, TACI), které vážou BAFF, a jejich výskyt na subpopulaci B lymfocytů. Dle literatury (Ng et al., 2004) by se tyto receptory měly vyskytovat i na T lymfocytech. Jaká je souvislost mezi BAFF a T lymfocyty je otázkou.

Závěrem lze říci, že solubilní i vázaný BAFF na B lymfocytech se jeví jako užitečný marker humorální rejeckce. U všech námi sledovaných pacientů docházelo v průběhu AMR

ke snížení solubilního BAFF a ke zvýšení vázaného BAFF na subpopulacích B lymfocytů i na B lymfocytech jako celku.

9 Závěry

1. Hladiny solubilního BAFF ani BAFF vázaného na B lymfocytech před transplantací se nelišily u pacientů s diagnostikovanou akutní humorální rejekcí a bez rejekce.
2. Koncentrace solubilního BAFF jsou signifikantně nižší u pacientů s humorální, celulární i zároveň probíhající celulární a humorální rejekcí ve srovnání s pacienty bez rejekce.
3. U pacientů v průběhu akutní protilátkami-zprostředkované rejekce signifikantně klesla hladina BAFF cytokinu v séru v průběhu rejekce. U pacientů bez rejekce nebyl pokles s BAFF v čase zaznamenán.
4. U pacientů s akutní humorální rejekcí došlo k statisticky významnému nárůstu BAFF vázaného na B lymfocytech v době rejekce. U pacientů bez rejekce nedošlo k žádné změně hladiny BAFF po celé sledované období.
5. BAFF se váže na receptory na všech populacích B lymfocytů avšak nejvíce na plazmatických buňkách.
6. Naše práce naznačuje, že BAFF by mohl sloužit jako marker humorální rejekce a to jak poklesem hladiny solubilního cytokinu, tak nárůstem membránově vázaného BAFF na B lymfocytech.

10 Seznam použité literatury

Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(2):149-57.

Allman, D., & Miller, J. P. (). Common Lymphoid Progenitors , Early B-Lineage Precursors , and IL-7. *Immunologic Research*. 2003; 27(2-3), 131–139.

Banham G, Prezzi D, Harford S, Taylor CJ, Hamer R, Higgins R, Bradley JA, Clatworthy MR. Elevated pretransplantation soluble BAFF is associated with an increased risk of acute antibody-mediated rejection. *Transplantation*. 2013;96(4):413-20.

Bartůňková J, Paulíková J, Paulík M. Vyšetřovací metody v imunologii. 2.vyd. Praha:Grada,2011:68-69.

Bassing, C. H., Swat, W., & Alt, F. W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*.2002;109,45–55.

Batten M, Groom J, Cachero TG, Qian F, Schneider P, Tschopp J, Browning JL, Mackay F.BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med*. 2000;192(10):1453-66.

Böhmig G, Regele H. Diagnosis and treatment of antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transpl Int*. 2003;16(11):773-87.

Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 2006.18(5):263-75.

Brown VI, Hulitt J, Fish J, Sheen C, Bruno M, Xu Q, Carroll M, Fang J, Teachey D, Grupp SA. Thymic stromal-derived lymphopoietin induces proliferation of pre-B leukemia and antagonizes mTOR inhibitors, suggesting a role for interleukin-7Ralpha signaling. *Cancer Res*.2007;67(20):9963-70.

Burns, J. M., Cornell, L. D., Perry, D. K., Pollinger, H. S., Gloor, J. M., Kremers, W. K., Stegall, M. D. Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2008; 8(12), 2684–94.

- Cancro MP. The BLYS family of ligands and receptors: an archetype for niche-specific homeostatic regulation. *Immunol Rev.* 2004;202:237-49.
- Colvin R.B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18(4): 1046-56, 2007).
- Cornall RJ, Goodnow CC, Cyster JG The regulation of self-reactive B cells. *Curr Opin Immunol.* 1995;7(6):804-11.
- Craxton A, Draves KE, Gruppi A, Clark EA. BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway. *J Exp Med.* 2005;202(10):1363-74.
- Darce JR, Arendt BK, Wu X, Jelinek DF. Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol.* 2007;179(11):7276-86.
- Dos Santos DC, Campos EF, Saraiva Câmara NO, David DS, Malheiros DM. Compartment-specific expression of natural killer cell markers in renal transplantation: immune profile in acute rejection. *Transpl Int.* 2016;29(4):443-52.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007;28(3):138-45.
- Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, Held E, Riethmüller G, Land W, Albert E. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol.* 1991;86(3):464-70.
- Figgett WA, Fairfax K, Vincent FB, Le Page MA, Katik I, Deliyanti D, Quah PS, Verma P, Grumont R, Gerondakis S, Hertzog P, O'Reilly LA, Strasser A, Mackay F. The TACI receptor regulates T-cell-independent marginal zone B cell responses through innate activation-induced cell death. *Immunity.* 2013;39(3):573-83.
- Gardam S, Sierro F, Basten A, Mackay F, Brink R. TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity.* 2008;28(3):391-401.
- Garibyan L, Lobito AA, Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Invest.* 2007;117(6):1550-7.

- Ginzler EM, Wax S, Rajeswaran A, et al. Atacicept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis: results of a prematurely terminated trial. *Arthritis Res Ther.* 2012; 14: R33.
- Goenka R, Matthews AH, Zhang B, O'Neill PJ, Scholz JL, Migone TS, Leonard WJ, Stohl W, Hershberg U, Cancro MP Local BLyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J Exp Med.* 2014;211(1):45-56.
- Goodnow CC, Cyster JG, Hartley SB, Bell SE, Cooke MP, Healy JI, Akkaraju S, Rathmell JC, Pogue SL, Shokat KP. Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv Immunol.* 1995;59:279-368.
- Gorbacheva V, Ayasoufi K, Fan R, Baldwin WM 3rd, Valujskikh A. B cell activating factor (BAFF) and a proliferation inducing ligand (APRIL) mediate CD40-independent help by memory CD4 T cells. *Am J Transplant.* 2015;15(2):346-57.
- Greenfield W, Ruben SM, Olsen HS, Fikes J, Hilbert DM. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science.* 1999. 9;285(5425):260-3.
- Groom JR, Fletcher CA, Walters SN, Grey ST, Watt SV, Sweet MJ, Smyth MJ, Mackay CR, Mackay F BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells. *J Exp Med.* 2007;204(8):1959-71.
- Gross JA, Dillon SR, Mudri S, Johnston J, Littau A, Roque R, Rixon M, Schou O, Foley KP, Haugen H, McMillen S, Waggle K, Schreckhise RW, Shoemaker K, Vu T, Moore M, Grossman A, Clegg CH TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLyS. *Immunity.* 2001;15(2):289-302.
- Hardenberg G, Planelles L, Schwarte CM, van Bostelen L, Le Huong T, Hahne M, Medema JP Specific TLR ligands regulate APRIL secretion by dendritic cells in a PKR-dependent manner. *Eur J Immunol.* 2007;37(10):2900-11.
- He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, Shan M, Xiong H, Bussel JB, Chiu A, Puel A, Reichenbach J, Marodi L, Döffinger R, Vasconcelos J, Issekutz A, Krause J, Davies G, Li X, Grimbacher B, Plebani A, Meffre E, Picard C, Cunningham-Rundles C, Casanova JL, Cerutti A. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat Immunol.* 2010;11(9):836-45.

Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004; 15;173(8):4828-37.

Hirohashi, T., Uehara, S., Chase, C. M., DellaPelle, P., Madsen, J. C., Russell, P. S., & Colvin, R. B. Complement Independent Antibody-Mediated Endarteritis and Transplant Arteriopathy in Mice. *American Journal of Transplantation.* (2010);10(3), 510–517.

Hořejší V, Bartůňková J (2009). *Základy imunologie.* Prague: TRITON.

Huard B, Arlettaz L, Ambrose C, Kindler V, Mauri D, Roosnek E, Tschopp J, Schneider P, French LE. BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol.* 2004;16(3):467-75.

Hymowitz SG, Patel DR, Wallweber HJ, Runyon S, Yan M, Yin J, Shriver SK, Gordon NC, Pan B, Skelton NJ, Kelley RF, Starovasnik MA Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem.* 2005;280(8):7218-27.

Chang SK, Arendt BK, Darce JR, Wu X, Jelinek DF A role for BLYS in the activation of innate immune cells. *Blood.* 2006;108(8):2687-94.

Choo, S. Y. (2007). The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*, 48(1), 11–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2628004/>

Infantino S, Tarlinton DM. Feeling a little SYK after mixing BAFF with BCR. *Immunity.* 2013;38(3):406-8.

Katsenelson N, Kanswal S, Puig M, Mostowski H, Verthelyi D, Akkoyunlu M. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *Eur J Immunol.* 2007;37(7):1785-95.

Kayagaki N, Yan M, Seshasayee D, Wang H, Lee W, French DM, Grewal IS, Cochran AG, Gordon NC, Yin J, Starovasnik MA, Dixit VM. BAFF/BLYS receptor 3 binds the B cell

survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity*. 2002;17(4):515-24.

Kearney JF. Innate-like B cells. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26(4):377-83.

Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Sep 7;343(10):702-9.

Krejsek J, Kopecký O. (2004): *Klinická imunologie*. Hradec Kralove: Nucleus.

Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U, Birmelin J, Rizzi M, Grimbacher B, Plebani A, Lougaris V, Quinti I, Thon V, Litzman J, Schlesier M, Warnatz K, Thiel J, Rolink AG, Eibel H. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. *Immunol*. 2012;188(1):497-503.

Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu CM, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *EJ Exp Med*. 2005;201(2):195-200.

Lateef A, Petri M. Biologics in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2010; 22: 504.

Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg JE, Mariette X. B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells from patients with primary Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*. 2008;67(2):185-92.

Liu Y, Xu L, Opalka N, Kappler J, Shu HB, Zhang G. Crystal structure of sTALL-1 reveals a virus-like assembly of TNF family ligands. *Cell*. 2002;108(3):383-94.

López-Fraga M, Fernández R, Albar JP, Hahne M. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep*. 2001;2(10):945-51.

Losi CG, Silini A, Fiorini C, Soresina A, Meini A, Ferrari S, Notarangelo LD, Lougaris V, Plebani A. Mutational analysis of human BAFF receptor TNFRSF13C (BAFF-R) in patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2005;25(5):496-502.

Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol*. 2009. 9(7):491-502.

- Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:231-64.
- Mackay F, Leung H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol.* 2006;18(5):284-9.
- Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):323-35.
- Martinez-Gallo M, Radigan L, Almejún MB, Martínez-Pomar N, Matamoros N, Cunningham-Rundles C. TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(2):468-76.
- Martínez-Pomar N, Detková D, Arostegui JI, Alvarez A, Soler-Palacín P, Vidaller A, Espanol T, Sampalo A, de Gracia J, Hernandez M, Yagüe J, Matamoros N. Role of TNFRSF13B variants in patients with common variable immunodeficiency. *Blood.* 2009;114(13):2846-8.
- Mauviyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11(6):609-18.
- McCarthy DD, Kujawa J, Wilson C, Papandile A, Poreci U, Porfilio EA, Ward L, Lawson MA, Macpherson AJ, McCoy KD, Pei Y, Novak L, Lee JY, Julian BA, Novak J, Ranger A, Gommerman JL, Browning JL. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *J Clin Invest.* 2011;121(10):3991-4002.
- Mecklenbräuker I, Kalled SL, Leitges M, Mackay F, Tarakhovsky A. Regulation of B-cell survival by BAFF-dependent PKCdelta-mediated nuclear signalling. *Nature.* 2004;431(7007):456-61.
- Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, Soppet D, Charters M, Gentz R, Parmelee D, Li Y, Galperina O, Giri J, Roschke V, Nardelli B, Carrell J, Sosnovtseva S, Greenfield W, Ruben SM, Olsen HS, Fikes J, Hilbert DM. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science.* 1999;285(5425):260-3.
- Morimoto S, Nakano S, Watanabe T, Tamayama Y, Mitsuo A, Nakiri Y, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, Kobata T, Takasaki Y. Expression of B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family (BAFF) in T cells in active systemic lupus erythematosus: the role of BAFF in T cell-dependent B cell pathogenic autoantibody production. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46(7):1083-6.

- Nagy G, Koncz A, Perl A. T- and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Crit Rev Immunol.* 2005;25(2):123-40.
- Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, Moore PA, Olsen HS, Migone TS, Sosnovtseva S, Carrell JA, Feng P, Giri JG, Hilbert DM Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood.* 2001;97(1):198-204.
- Ng LG, Sutherland AP, Newton R, Qian F, Cachero TG, Scott ML, Thompson JS, Wheway J, Chtanova T, Groom J, Sutton IJ, Xin C, Tangye SG, Kalled SL, Mackay F, Mackay CR. B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol.* 2004;173(2):807-17.
- O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, Lin LL, Mantchev GT, Bram RJ, Noelle RJ. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med.* 2004;199(1):91-8.
- Oliver AM, Martin F, Gartland GL, Carter RH, Kearney JF. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol.* 1997;27(9):2366-74.
- Opelz G, Lancet Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies 365 (9470): 1570-6, 2005.
- Opelz G, Wujciak T, Döhler B, Scherer S, Mytilineos. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev J Immunogenet;* 1999;1(3):334-42.
- D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. Alloreactivity from human viral specific memory T-cells. *Transpl Immunol.* 2010;23(4):149-55.
- Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, Björkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL, Bacchelli C, Gaspar HB, Offer S, Behrens TW, Grimbacher B, Hammarström L. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2007;39(4):429-30.
- Park JH, Resnick ES, Cunningham-Rundles C. Perspectives on common variable immune deficiency. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1246:41-9.
- Patke A, Mecklenbräuer I, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Tarakhovskiy A. BAFF controls B cell metabolic fitness through a PKC beta- and Akt-dependent mechanism. *J Exp Med.* 2006;203(11):2551-62.

- Pradet-Balade B, Medema JP, López-Fraga M, Lozano JC, Kolfschoten GM, Picard A, Martínez-A C, Garcia-Sanz JA, H ahne M An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein. *EMBO J.* 2002;21(21):5711-20.
- Watson CJ, DARK JH, Organ transplantation:historici perspective and current practice. *Br J Anaesth.* 2012;108(1):29-42.
- Roschke V, Sosnovtseva S, Ward CD, Hong JS, Smith R, Albert V, Stohl W, Baker KP, Ullrich S, Nardelli B, Hilbert DM, Migone TS. BLYS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases .*J Immunol.* 2002;169(8):4314-21.
- Rose NR.Autoimmunity, infection and adjuvants.*Lupus.* 2010;19(4):354-8.
- Rossmann P, Jirka J. Rejekce transplantované ledviny. Biopstické nálezy, jejich klasifikace, význam a využití, *Tigis Aktuality v nefrologii*, 2003;2.
- Ruddle NH, Akirav EM.Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response.*J Immunol.* 2009;183(4):2205-12.
- Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarström Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, Schäffer AA, Hammarström L, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans.*Nat Genet.* 2005;37(8):820-8.
- Scharenberg AM, Hannibal MC, Torgerson T, Ochs HD,Rawlings DJ. Common Variable Immune Deficiency Overwiev. In Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP. Editors GeneReviews Seattle (WA): University of Washington.2006.
- Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C, Cassatella MA G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLYS. *J Exp Med.* 2003;197(3):297-302
- Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity.* 2003;18(2):279-88.

Shapiro-Shelef M, Calame K Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):230-42.

Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, Ambrose C, Lawton P, Bixler S, Acha-Orbea H, Valmori D, Romero P, Werner-Favre C, Zubler RH, Browning JL, Tschopp J. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*. 1999;189(11):1747-56.

Schneider P, Takatsuka H, Wilson A, Mackay F, Tardivel A, Lens S, Cachero TG, Finke D, Beermann F, Tschopp J. Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen. *J Exp Med*. 2001;194(11):1691-7.

Schweighoffer E, Vanes L, Nys J, Cantrell D, McCleary S, Smithers N, Tybulewicz VL. The BAFF receptor transduces survival signals by co-opting the B cell receptor signaling pathway. *Immunity*. 2013 Mar 21;38(3):475-88.

Slifka, M. K., & Ahmed, R.. Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Current Opinion in Immunology*. 1998;10(3), 252–8.

Snanoudj R, Candon S, Roelen DL, Jais JP, Claas FH, Legendre C, Chatenoud L. Peripheral B-cell phenotype and BAFF levels are associated with HLA immunization in patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation*. 2014;97(9):917-24.

Stadanlick JE, Kaileh M, Karnell FG, Scholz JL, Miller JP, Quinn WJ 3rd, Brezski RJ, Trembl LS, Jordan KA, Monroe JG, Sen R, Cancro MP. Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BlyS signaling. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1379-87.

Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2012;(11):670-8.

Stegall, M. D., Moore, N., Taner, T., Li, H., & Dean, P. G.. Down-regulating humoral immune responses: implications for organ transplantation. *Transplantation*. 2014; 15;97(3):247-57.

Stein JV, López-Fraga M, Elustondo FA, Carvalho-Pinto CE, Rodríguez D, Gómez-Caro R, De Jong J, Martínez-A C, Medema JP, Hahne M APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest*. 2002;109(12):1587-98.

Sutherland AP, Ng LG, Fletcher CA, Shum B, Newton RA, Grey ST, Rolph MS, Mackay F, Mackay CR. BAFF augments certain Th1-associated inflammatory responses. *J Immunol.* 2005;174(9):5537-44.

Švachová V, Sekerková A, Hrubá P, Tycová I, Rodová M, Čečrdlová E, Slatinská J, Honsová E, Stríž I, Viklický O. Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cell is associated with allograft rejection. *Transpl Int.* 2016;29(5):540-8.

Tangye SG. Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends Immunol.* 2011;32(12):595-602.

Tardivel A, Tinel A, Lens S, Steiner QG, Sauberli E, Wilson A, Mackay F, Rolink AG, Beermann F, Tschopp J, Schneider P. The anti-apoptotic factor Bcl-2 can functionally substitute for the B cell survival but not for the marginal zone B cell differentiation activity of BAFF. *Eur J Immunol.* 2004;34(2):509-18.

Thibault-Espitia A, Foucher Y, Danger R, Migone T, Pallier A, Castagnet S, G-Gueguen C, Devys A, C-Gautier A, Giral M, Soulillou JP, Brouard S. BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies. *Am J Transplant.* 2012;12(10):2754-62.

Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, Mackay F, Brink R. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity.* 2004;20(6):785-98.

Thompson JS, Bixler SA, Qian F, Vora K, Scott ML, Cachero TG, Hession C, Schneider P, Sizing ID, Mullen C, Strauch K, Zafari M, Benjamin CD, Tschopp J, Browning JL, Ambrose C. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science.* 2001;293(5537):2108-11.

Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, Wang L, Lefevre EA, Cachero TG, MacKay F, Bixler SA, Zafari M, Liu ZY, Woodcock SA, Qian F, Batten M, Madry C, Richard Y, Benjamin CD, Browning JL, Tsapis A, Tschopp J, Ambrose C. BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J Exp Med.* 2000;192(1):129-35.

Viklický, O., Janoušek, L., Baláž, P., a kolektiv (2008). *Transplantace ledviny v klinické praxi*, Grada Publishing, a.s.

- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M., & Mond, J. J. B-cell activation by Tcell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews*. 2000;176(1), 154–70.
- Warnatz K, Salzer U, Rizzi M, Fischer B, Gutenberger S, Böhm J, Kienzler AK, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Rakhmanov M, Schlesier M, Grimbacher B, Peter HH, Eibel H. B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13945-50.
- Woo YJ, Yoon BY, Jhun JY, Oh HJ, Min SW, Cho ML, Park SH, Kim HY, Min JK Regulation of B cell activating factor (BAFF) receptor expression by NF-KB signaling in rheumatoid arthritis B cells. *Exp Mol Med*. 2011;43(6):350-7.
- Yang M, Hase H, Legarda-Addison D, Varughese L, Seed B, Ting AT B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol*. 2005;175(5):2814-24.
- Xu, H., He, X., Liu, Q., Shi, D., Chen, Y., Zhu, Y., & Zhang, X. Abnormal high expression of B-cell activating factor belonging to the TNF superfamily (BAFF) associated with long-term outcome in kidney transplant recipients. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41(5), 1552–6.
- 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.
- Zarkhin, V., Li, L., & Sarwal, M. M. (2009). BAFF may modulate the rate of B-cell repopulation after rituximab therapy for acute renal transplant rejection. *Transplantation*, 2009;88(10), 1229–30.
- Zhang M, Ko KH, Lam QL, Lo CK, Srivastava G, Zheng B, Lau YL, Lu L. Expression and function of TNF family member B cell-activating factor in the development of autoimmune arthritis. *Int Immunol*. 2005;17(8):1081-92.
- Zhang L, Radigan L, Salzer U, Behrens TW, Grimbacher B, Diaz G, Bussel J, Cunningham-Rundles C Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(5):1178-85.

Zotos D, Tarlinton DM. Determining germinal centre B cell fate. *Trends Immunol.* 2012;33(6):281-8.