

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**

**Analýza poruch VDJ uspořádání a jejich vliv na produkci imunoglobulinů
u populace CD19⁺IgM⁺CD27⁻CD21^{low}CD38^{low}CD24^{+/-} B lymfocytů pacientů s COVID**

Lucie Nováková

Biotechnologický ústav Akademie věd České Republiky, Praha, 2009

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Šárka Růžičková

Tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury a pod vedením vedoucího diplomové práce.

V Praze 26. dubna 2009

Lucie Nováková

Děkuji Šárce Růžičkové za ochotu, trpělivost, vstřícný přístup a cenné odborné rady a informace, kterými obohatila mé znalosti studované problematiky v průběhu vzniku této práce.

Děkuji Ireně Veselé, Jiřině Kinkorové a Petru Nohovi za pomoc na praktické části diplomové práce a za vytvoření velmi příjemného pracovního prostředí.

Tomáši Kalinovi děkuji za provedení analýz na průtokovém cytometru a za uvedení do problematiky průtokové cytometrie.

Marcele Vlkové děkuji za poskytnutí výsledků jejich analýz B lymfocytů a klinických dat CVID pacientů.

Tato diplomová práce byla vypracována v letech 2007-2009 v Laboratoři diagnostiky autoimunitních onemocnění Biotechnologického ústavu AV ČR a byla podpořena výzkumným záměrem IGA MZ NR/9198-3 Charakteristika B lymfocytárních subpopulací u pacientů s běžným variabilním imunodeficitem.

The analysis of VDJ rearrangements and their role in the regulation of immunoglobulin production in CD19⁺IgM⁺CD27⁻CD21^{low}CD38^{low}CD24^{+/-} B cell population in CVID patients

The increased frequencies of two novel B cell populations in peripheral blood of CVID patients compared to healthy donors were observed using flow cytometry in the study supported by the grant IGA MZ ČR NR/9198-3. These B cell populations were defined as CD19⁺IgM⁺CD27⁻CD21^{low}CD38^{low}CD24⁺ and CD19⁺IgM⁺CD27⁻CD21^{low}CD38^{low}CD24⁻.

Since none of the found populations has ever been described, the aim of this thesis was to further characterize these populations with focus on analysis of variable regions of the heavy chains of immunoglobulins produced by cells of these populations.

Flow cytometry, single cell sorting, single-cell RT-PCR, IgV_H-specific PCR amplification and cycle sequencing were employed to perform the molecular analysis of the production of immunoglobulin mRNA in individual B lymphocytes. Both populations from CVID patient and healthy control were examined. Finally, the statistical analysis was used to evaluate the differences in expression of variable regions of the heavy chains of immunoglobulins.

Significant differences in V_H, D_H, and J_H usage, mutational frequencies, distribution of silent and replacement mutations, CDR3 length and composition and isotope switching were discovered between above mentioned B cell populations within both CVID patient and healthy donor as well as between CVID patient and healthy donor.

Since the populations did not express surface marker CD27 they were originally considered as naive B cells. In this regard, the most interesting finding is the presence of signs of antigen-driven selection and affinity maturation in both CD27⁻ B cell populations. This feature was apparent in analyzed B cells both of CVID patient and healthy control and is contradictory to characteristics so far known for CD27⁻ naive B cells.

Our findings suggest that these populations may pass through germinal centre reaction and might represent a novel kind of memory B cells in humans. In addition, our findings may support the hypothesis that observed B cell populations play a crucial role in the regulation of homeostasis in immune system in healthy people which can be impaired in CVID patients where these B cells are remarkably expanded.

These findings seem to be very intriguing and further research should be carried out to describe these populations more precisely which could contribute to better understanding of CVID pathogenesis and development.

Key words:

common variable immunodeficiency, B lymphocytes, CD antigens, flow cytometry, single-cell RT-PCR, VDJ rearrangement

Klíčová slova:

běžný variabilní imunodeficit, B lymfocyty, CD antigeny, průtoková cytometrie, single-cell RT-PCR, VDJ přestavba

1	Úvod	10
2	Literární přehled	11
2.1	Imunitní systém člověka	11
2.1.1	Nespecifická imunita	11
2.1.2	Specifická imunita	11
2.2	Imunoglobuliny	12
2.2.1	Struktura imunoglobulinu	12
2.2.2	Izotypy imunoglobulinů	14
2.3	B lymfocyty	15
2.3.1	Vývoj B lymfocytů	16
2.3.1.1	Centrální vývoj B lymfocytů	16
2.3.1.1.1	D-J přeskupení genů pro těžký řetězec Ig	16
2.3.1.1.2	V-DJ přeskupení genů pro těžký řetězec Ig	17
2.3.1.1.3	Pre-B receptor	18
2.3.1.1.4	Přeskupování genů pro lehké řetězce imunoglobulinů	18
2.3.1.2	Periferní vývoj B lymfocytů	19
2.3.1.2.1	Transientní buňky	19
2.3.1.2.2	Folikulární buňky	20
2.3.1.2.3	Buňky marginální zóny	20
2.3.1.2.4	Somatická hypermutace	21
2.3.1.2.4.1	Mechanismy vzniku somatických hypermutací	21
2.3.1.2.5	Izotypový přesmyk	23
2.3.1.2.5.1	Mechanismus izotypového přesmyku	23
2.3.1.2.6	Paměťové buňky	24
2.3.1.2.7	Plasmatické buňky	25
2.3.1.3	B lymfocyty v periferní krvi	26
2.3.1.4	Markery B buněčných populací	27
2.3.1.4.1	CD19	27
2.3.1.4.2	CD21	27
2.3.1.4.3	CD24	27
2.3.1.4.4	CD27	28
2.3.1.4.5	CD38	28
2.4	Běžný variabilní imunodeficit (common variable immunodeficiency, CVID)	28
2.4.1	Diagnóza	29
2.4.2	Klinické projevy	29

2.4.2.1	Imunologický obraz CVID pacientů.....	30
2.4.2.1.1	Humorální imunita	30
2.4.2.1.2	Buněčná imunita	30
2.4.2.2	Etiopatogeneze CVID	31
2.4.2.2.1	TACI deficience	32
2.4.2.2.2	CD19 deficience.....	32
2.4.2.2.3	ICOS deficience	32
2.4.2.3	Léčba	33
2.4.2.3.1	Klasifikace CVID pacientů	33
2.4.2.3.2	EURO klasifikace	34
2.4.3	CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁻ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ^{+/-} populace B lymfocytů.....	35
3	Cíle práce.....	37
4	Materiál a metody	38
4.1	Zpracování periferní krve.....	38
4.2	Značení buněčné suspenze pro průtokovou cytometrii a třídění buněk	38
4.3	RT-PCR na úrovni jedné buňky (single cell RT-PCR).....	39
4.4	Amplifikace variabilních oblastí genů pro těžké řetězce imunoglobulinů	42
4.4.1	Amplifikace externími primery	42
4.4.2	Amplifikace interními primery.....	43
4.5	Sledování přítomnosti specifického PCR produktu.....	44
4.6	Purifikace PCR produktů	45
4.7	Sekvenování PCR produktů.....	45
4.8	Precipitace sekvenačního produktu etanolem	46
4.9	Sekvenování.....	46
4.10	Vyhodnocování a analýza přeskupených V _H D _H J _H genů pro těžké řetězce imunoglobulinů	47
4.11	Statistická analýza	47
4.12	Seznam použitých chemikálií a přístrojů.....	49
4.12.1	Chemikálie a kity	49
4.12.2	Protilátky.....	50
4.12.3	Roztoky.....	51

4.12.4	Přístroje a vybavení.....	52
5	Výsledky	53
5.1	Klinické parametry analyzované skupiny CVID pacientů.....	53
5.2	Analýza frekvencí B buněčných populací CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ⁺ a CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ⁻ průtokovým cytometrem	54
5.3	Analýza genů pro variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů jednotlivých buněk z populací CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ⁺ a CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ⁻ B lymfocytů	55
5.3.1	Klinické parametry CVID pacienta	56
5.3.2	Distribuce transkriptů mRNA pro IgM a IgG izotypy imunoglobulinů v jednotlivých populacích	56
5.3.3	Analýza V _H D _H J _H přeskupení v transkriptech pro izotyp IgM.....	57
5.3.3.1	Zastoupení V _H genových rodin.....	57
5.3.3.2	Zastoupení V _H genových segmentů	59
5.3.3.3	Zastoupení D _H genových rodin.....	61
5.3.3.4	Zastoupení J _H genových segmentů	63
5.3.3.5	Mutační frekvence	64
5.3.3.6	Distribuce záměnných a tichých mutací	66
5.3.3.7	Distribuce délek CDR3 oblastí	68
5.3.3.8	Aminokyselinové složení CDR3 oblastí.....	69
5.3.4	Analýza V _H D _H J _H přeskupení v transkriptech pro izotyp IgG	71
5.3.5	Klonální příbuznost.....	72
6	Diskuze	73
6.1	Analýza frekvencí B buněčných populací CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ⁺ a CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ⁻ průtokovým cytometrem	73
6.2	Analýza genů pro variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů jednotlivých buněk z populací CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ⁺ a CD19 ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺ CD21 ^{low} CD38 ^{low} CD24 ⁻ B lymfocytů	73
6.2.1	Distribuce transkriptů mRNA izotypů IgM a IgG v jednotlivých populacích.....	74
6.2.2	Analýza V _H D _H J _H přeskupení v transkriptech pro izotyp IgM.....	74
6.2.2.1	Zastoupení V _H genových rodin.....	74
6.2.2.2	Zastoupení V _H genových segmentů	75
6.2.2.3	Zastoupení D _H genových rodin.....	76
6.2.2.4	Zastoupení J _H genových segmentů	77

6.2.2.5	Mutační frekvence a distribuce záměnných a tichých mutací.....	77
6.2.2.6	Distribuce délek CDR3 oblastí	78
6.2.2.7	Aminokyselinové složení CDR3 oblastí.....	79
6.2.3	Analýza V _H D _H J _H přeskupení v transkriptech pro izotyp IgG	79
6.2.4	Klonální příbuznost.....	80
7	Souhrn	81
8	Seznam citované literatury	83
9	Seznam zkratek.....	93

1 Úvod

Imunitní systém člověka je velmi složitý komplex vzájemně propojených mechanismů, které zajišťují odolnost organismu vůči infekcím z vnějšího prostředí a regulují jeho vnitřní homeostázu. Defekty složek imunitního systému způsobují řadu více či méně závažných onemocnění, přičemž nejčastěji se jedná o projevy autoimunitních procesů nebo imunodeficitních stavů.

Jednou z nejčastějších primárních imunodeficiencí je běžný variabilní imunodeficit (common variable immunodeficiency, CVID). Tato choroba je charakterizována zejména výrazně sníženou koncentrací protilátek v krvi pacientů, což způsobuje jejich větší náchylnost k řadě infekcí. Závažnost této nemoci souvisí také se skutečností, že ve více než 80% případů nejsou doposud známy prvotní příčiny, které vedou k nedostatečné tvorbě imunoglobulinů. Jedinou možností léčby pacientů proto zůstává substituce chybějících protilátek v periferní krvi.

Důležitou charakteristikou CVID onemocnění jsou změny ve frekvencích populací B lymfocytů. V rámci grantové studie (IGA MZ ČR NR/9198-3) zaměřené na komplexní analýzu B buněčných subpopulací v periferní krvi CVID pacientů pomocí průtokové cytometrie byly nalezeny dvě populace B lymfocytů, jejichž frekvence v periferní krvi CVID pacientů byla výrazně vyšší než u zdravých dárců. Tyto populace s imunofenotypem $CD19^+IgM^+CD27^+CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^+CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ nebyly doposud popsány u zdravých dárců, pacientů s CVID, ani u jiné primární imunodeficiency, stejně jako nejsou známy jejich další buněčné případně molekulární charakteristiky.

Cílem této diplomové práce bylo provést prvotní analýzu uvedených populací B lymfocytů. Protože hlavní funkcí B buněk je tvorba protilátek, zaměřili jsme se na studium imunoglobulinů tvořených těmito populacemi B lymfocytů. Konkrétně jsme svůj zájem směřovali k analýze variabilních oblastí genů pro těžké řetězce imunoglobulinů, což jsou úseky, které během vývoje B lymfocytu prochází rekombinačními a mutačními procesy a proto zaznamenávají velký počet změn.

Výsledky této práce jsou příspěvkem jednak k objasnění charakteru objevených B lymfocytárních populací ve smyslu jejich diferenciaci obecně, ale také k pochopení významu těchto B lymfocytů v patogenezi CVID onemocnění.

2 Literární přehled

2.1 Imunitní systém člověka

Imunitní systém je souhrn velmi všestranných, proměnlivých a přizpůsobivých mechanismů, které zajišťují integritu organismu. Úkolem imunitního systému je rozeznat, lokalizovat a zlikvidovat jak cizorodé škodliviny a patogenní organismy, tak i potenciálně nebezpečné struktury a buňky vlastního organismu. Imunitní systém se skládá z části nespecifické a specifické, které ve vzájemné spolupráci dokážou ochránit organismus před velkou škálou infekcí a škodlivin (Hořejší a Bartůňková, 2005).

2.1.1 Nespecifická imunita

Nespecifická nebo také neadaptivní či přirozená imunita hraje důležitou úlohu v prvních fázích infekce. Mechanismy nespecifické imunity zodpovídají za schopnost rozeznat a zlikvidovat velké množství různých škodlivin a infekčních organismů, díky jejím společným strukturním a funkčním rysům. Navíc jsou mechanismy nespecifické imunity v organismu předem připraveny, takže jejich aktivace je velmi rychlá. Neadaptivní imunita však nemá imunologickou paměť, a tak je při opakované infekci síla a rychlost imunitní reakce stejná jako při prvním setkání s patogenem (Goldsby *et al.*, 2006).

Přirozená imunita je tvořena buněčnou a humorální složkou. Buněčná imunita je zajišťována především fagocyty, makrofágy, monocyty, granulocyty, dendritickými buňkami, mastocyty a dalšími buňkami. Mezi humorální složky patří zejména komplement, interferony, lektiny a jiné sérové proteiny (Bartůňková, 2002).

2.1.2 Specifická imunita

Specifická imunita je na rozdíl od nespecifické velmi variabilní a přizpůsobivá a na přítomnost antigenních částic v organismu odpovídá tvorbou vysoce specifických molekul. Ty pak účinně podněcují, řídí a zesilují imunitní reakce vedoucí k zneškodnění infekce. Navíc má specifická imunita imunologickou paměť, takže při opětovném setkání organismu se stejným infekčním agens je specifická imunitní odpověď mnohem rychlejší, než při prvním setkání s antigenem. Také specifická imunita je tvořena částí buněčnou a humorální. Buněčnou imunitu zajišťují především T lymfocyty, humorální pak zejména protilátky (imunoglobuliny; Hořejší a Bartůňková, 2005).

2.2 Imunoglobuliny

Protilátky představují důležitou součást specifické imunity. Jsou produkovány plazmatickými buňkami jako odpověď na setkání imunitního systému organismu s antigenem. Protilátky brání působení toxinů vazbou na jejich epitopy, opsonizují mikroorganismy, které jsou pak pohlceny fagocyty, a většina izotypů protilátek (kromě IgG4 a IgA) také aktivuje klasickou cestu komplementu (Hořejší a Bartůňková, 2005).

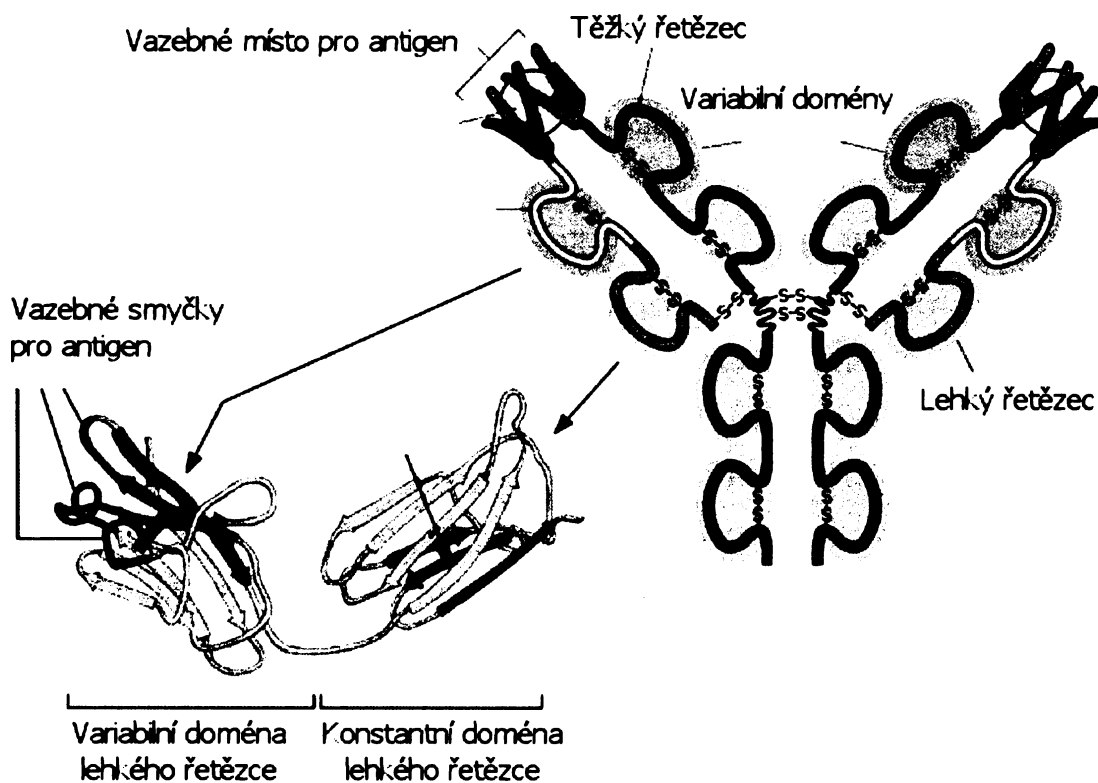
2.2.1 Struktura imunoglobulinu

Molekula protilátky se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců, které jsou spojeny cystinovými (disulfidickými) můstky (obr. 1).

Těžké řetězce obsahují 4 až 5 domén, a to jednu variabilní doménu (V_H) a 3 až 4 domény konstantní (C_H), které se označují μ , δ , γ , α a ϵ a rozhodují o příslušném izotypu protilátky, tj. IgM, IgD, IgG, IgA nebo IgE. Molekulová hmotnost těžkého řetězce je 50 až 75 kDa.

Lehký řetězec obsahuje pouze dvě domény – variabilní (V_L) a konstantní (C_L), které mohou být izotypu kappa (κ) nebo lambda (λ). Molekulová hmotnost lehkého řetězce je asi 25 kDa (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Každá variabilní i konstantní doména, je tvořena sekvencí 110 až 120 aminokyselin. Amino (NH_2) konec proteinového řetězce je ve variabilní části, karboxy (COO) konec pak v konstantní oblasti. Na karboxylovém konci těžkého řetězce je úsek 20 hydrofobních aminokyselin, kterými je protilátka zakotvena v membráně B lymfocytu. Tato membránová forma protilátky se nazývá B buněčný receptor (B cell receptor, BCR), který vytváří komplexy s dalšími signalizačními molekulami. Protilátky existují také v solubilní formě, pak mluvíme o sérových imunoglobulinech (Hořejší a Bartůňková, 2005).



Obr. 1: Struktura imunoglobulinu.

(upraveno podle <http://porpax.bio.miami.edu/~cmallery/255/255prot/immunog.jpg>)

Geny kódující lehké i těžké řetězce protilátek se v lidském genomu vyskytují ve formě tzv. genových segmentů (obr. 2). Těžké řetězce jsou kódovány segmenty na chromozomu 14, genové segmenty pro lehký řetězec kappa se nachází na chromozomu 2 a segmenty pro řetězec lambda na chromozomu 22. Variabilní části protilátek jsou kódovány segmenty V (variability), D (diversity), J (joining), konstantní pak segmenty C (constant). Jednotlivé segmenty jsou v zárodečné sekvenci DNA přítomny ve větším počtu. Konkrétně DNA sekvence pluripotentní kmenové buňky obsahuje 50 V_H segmentů (v 7 rodinách), 27 D_H segmentů (v 7 rodinách) a 6 J_H segmentů. Geny pro lehké řetězce obsahují segmentů méně, D segment neobsahují vůbec (Link a Schroeder, 2002). Při přeskupování genů dochází k náhodnému výběru segmentů tak, že při transkripci do mRNA je přepsán od každého typu pouze jeden segment (V-D-J, V-J). Pro obranyschopnost organismu vůči celé škále různých patogenů je důležité, že se jednotlivé segmenty více či méně liší svou nukleotidovou sekvencí, takže i výsledné polypeptidové řetězce vzniklé jejich přepisem mají různou aminokyselinovou sekvenci a strukturu vazebného místa pro antigen (Ivanov *et al.*, 2005).

V primární sekvenci imunoglobulinových genů (pro lehké i těžké řetězce) je možné rozlišit 3 hypervariabilní oblasti (complementarity determining region, CDR), které jsou od sebe odděleny čtyřmi relativně konzervativními úseky (framework, FR, obr. 3). CDR oblasti těžkých řetězců se označují jako CDR-H1, -H2, -H3 (heavy), CDR oblasti lehkých řetězců zkratkami CDR-L1, -L2, -L3 (light). Po překladu do polypeptidového řetězce vytvářejí FR oblasti proteinové lešení, které podpírá CDR oblasti těžkých i lehkých řetězců. CDR oblasti jsou umístěny blízko sebe a dohromady vytváří vazebné místo pro antigen. CDR-H1, -H2, -L1, -L2 tvoří vnější okraj, CDR-L3 tvoří bázi a CDRH3 leží uprostřed vazebného místa. CDR-H1, -H2, -L1 a -L2 jsou celé kódované V genovým segmentem a jsou tedy omezené jeho zárodečnou sekvencí. CDR-L3 a H3 jsou vytvořeny *de novo* při přeskupování genů spojením $V_L - J_L$, respektive $V_H - D_H - J_H$ segmentů. Přítomnost D segmentu a adice náhodných nukleotidů, které nejsou kódovány zárodečnou sekvencí, velice zvyšuje diverzitu CDR-H3 oblasti, a ta hraje zásadní roli při rozpoznání a vazbě antigenu (Ivanov *et al.*, 2005).

V	D	J	C μ	C δ	C γ 3	C γ 1	$\psi\epsilon$	Ca1	$\psi\gamma$	C γ 2	C γ 4	C ϵ	Ca2
1-29	1-27	1-6	IgM	IgD	IgG3	IgG1		IgA1		IgG2	IgG4	IgE	IgA2

Obr. 2: Rozmístění genových segmentů pro V, D, J a C oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů. (Upraveno podle Hořejší a Bartůňková, 2005).



Obr. 3: Rozmístění CDR a FR oblastí v genech pro variabilní části těžkých řetězců imunoglobulinů, (upraveno podle Hořejší a Bartůňková, 2005).

2.2.2 Izotypy imunoglobulinů

Podle typu konstantní oblasti těžkého řetězce lze rozlišit pět různých izotypů protilátek – IgM, IgD, IgG, IgA nebo IgE, které jsou kódovány genovými segmenty μ , δ , γ , α a ϵ .

Protilátky IgM se vyskytují v membránově vázané formě jako BCR a v sekretované formě, kdy vytváří pentamery a hexamery navzájem propojené

cystinovými můstky. IgM protilátky se vytváří jako první po setkání organismu s antigenem ještě před tím, než projde B lymfocyt izotypovým přesmykem a somatickou hypermutací. Mají tedy poměrně nízkou afinitu k antigenu, avšak díky tvorbě pentamerů a tedy vyšší aviditě, mohou efektivně vázat multivalentní antigeny (Hořejší a Bartůňková, 2005). IgM má větší velikost než ostatní izotypy, jen těžko se transportuje do tkání a proto se vyskytuje nejčastěji v krvi, méně pak v lymfě.

IgD je spolu s IgM exprimován na většině zralých B lymfocytů, které opouští kostní dřeň. Poté, co lymfocyt projde izotypovým přesmykem, je exprese IgD nenávratně ukončena. Funkce IgD není známa (Janeway, 2001).

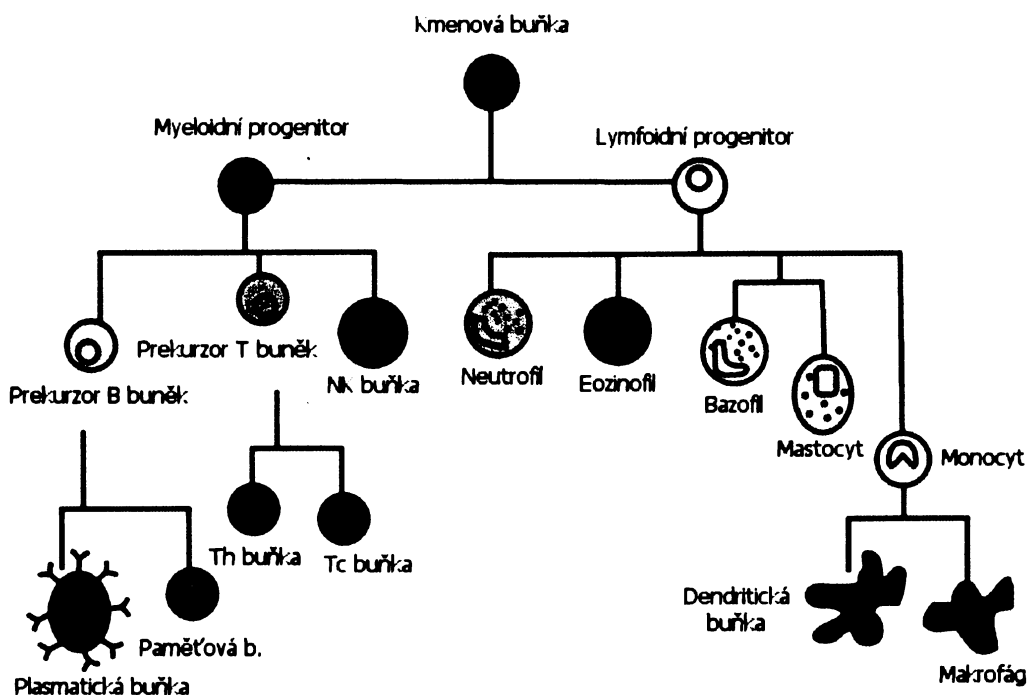
Nejhojnější protilátkou v krvi a extracelulární tekutině je IgG, které existuje ve čtyřech subtypech (IgG1 – IgG4). Ty se liší schopností vázat C1 fragment komplementu. IgG protilátky velmi dobře opsonizují patogeny.

Protilátky IgA se vyskytuje ve dvou formách. Slizniční IgA vytváří dimery, a je sekretováno na povrch sliznice zejména dýchacího a trávicího traktu. Sérová forma IgA vytváří vícevalentní struktury, a nachází se v krevním oběhu. Hlavní funkcí IgA protilátek je neutralizace antigenů.

Protilátky IgE jsou v krvi přítomny jen ve velmi nízké koncentraci, dobře se však váží na receptory žírných buněk. Vazba antigenu na IgE pak spouští uvolnění chemických mediátorů mastocytů, které indukují obranné reakce zejména proti mnohobuněčným parazitům (Hořejší a Bartůňková, 2005).

2.3 B lymfocyty

Hlavní funkcí B lymfocytů je tvorba protilátek, které jsou důležitou součástí specifické imunity. Protože se lidský organismus v průběhu života postupně setkává s různými infekčními částicemi, je nezbytné, aby i tvorba specifických protilátek, a tedy i B buněk, probíhala kontinuálně po celý život. Obnova B lymfocytů může probíhat díky existenci pluripotentních kmenových buněk, které jsou udržovány v kostní dřeni v malém počtu po celý život (Hořejší a Bartůňková, 2005). Z kmenových buněk se diferencují dvě základní linie – myeloidní a lymfoidní, které dávají vznik buňkám nespecifické a specifické imunity (obr. 4).



Obr. 4: Buňky imunitního systému.

Upraveno podle <http://textbookofbacteriology.net/cellsindefenses75.jpg>

2.3.1 Vývoj B lymfocytů

Vývoj B lymfocytů začíná u dospělého člověka v kostní dřeni, u plodu v játrech. Lymfocyty, které úspěšně projdou všemi vývojovými stádii a selekcí, pak migrují do sekundárních lymfoidních orgánů (Carsetti, 2000).

2.3.1.1 Centrální vývoj B lymfocytů

První část vývoje B buněk je nezávislá na přítomnosti antigenu. Z pluripotentní hematopoetické kmenové buňky se v kostní dřeni začínají diferencovat časná B buněčná stádia, která prochází postupným procesem přeskupování genů kódujících variabilní části imunoglobulinových řetězců (Warnatz a Schleiser, 2008). Přeskupování genů pro imunoglobuliny je zásadní proces nezbytný pro vznik širokého repertoáru antigenně specifických B buněčných receptorů rozpoznávajících různé antigeny. Probíhá na úrovni DNA a to v několika krocích (Goldsby *et al.*, 2006, obr. 5).

2.3.1.1.1 D-J přeskupení genů pro těžký řetězec Ig

Rekombinační proces zahajuje B lymfocyt ve stádiu progenitorové buňky (pro-B) a to na obou chromozomech současně (Hořejší a Bartůňková, 2005).

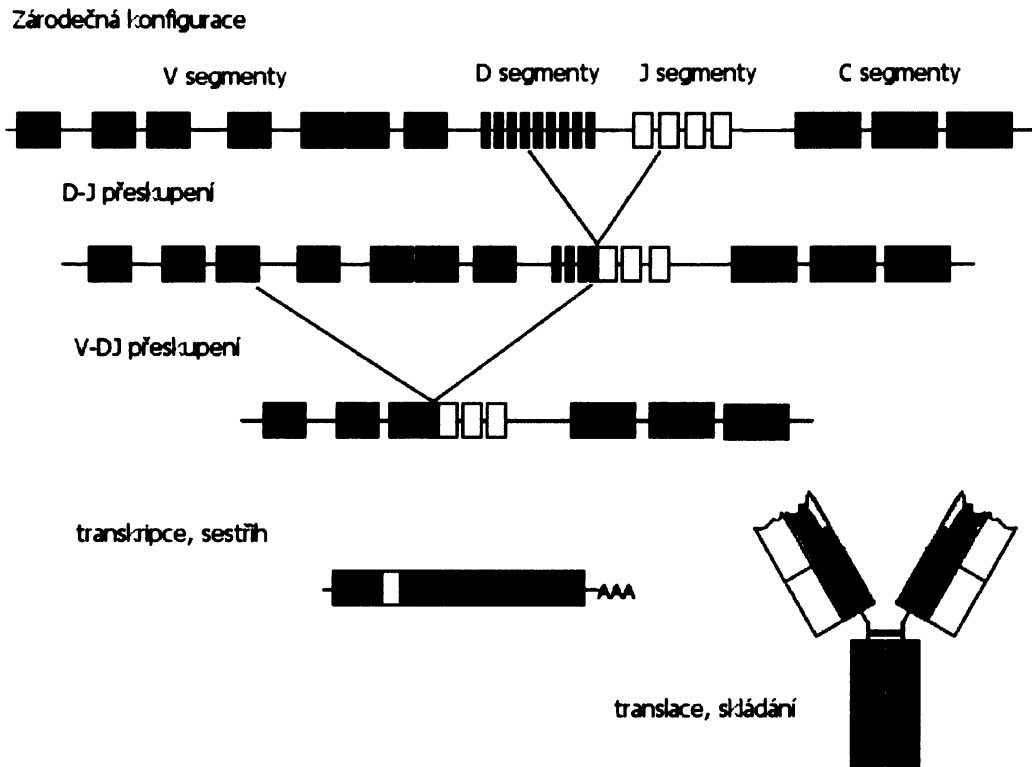
Po stranách genových segmentů (V, D, J) jsou umístěny rekombinační signální sekvence (recombination signal sequences, RSS). Jedna RSS je za 3' koncem každého V segmentu, jedna před 5' koncem každého J segmentu a D segment má z každé strany jednu RSS sekvenci. Nukleotidovou sekvenci RSS tvoří konzervativní palindromický heptamer a konzervovaný AT bohatý nonamer, které jsou odděleny sekvencí o délce 12 nebo 23 párů bází (tzv. spacers; Darlow a Stott, 2004).

RSS sekvence jsou přesným signálem pro komplex proteinů zprostředkovávajících rekombinaci, který je souhrnně nazýván rekombináza. Jeho hlavní komponentou jsou dva vysoce specifické enzymy RAG1 a RAG2, jež jsou exprimovány pouze ve vyvíjejících se lymfocytech (Goldsby *et al.*, 2006). Rekombináza rozezná signální sekvence mezi náhodnými D-D a J-J segmenty, vytvoří z DNA smyčku a celý úsek vyštěpí. Odstřižená smyčka se spojuje v kruhový útvar, se kterým nenávratně odchází z chromozomu veškeré D a J segmenty, které se na něm nacházejí (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Během spojování zbylých D, J segmentů dochází k dalším procesům, které zvyšují celkovou variabilitu nukleotidové sekvence CDR3 oblasti a mění její délku (Rosner *et al.*, 2001). Na koncích kódujících sekvencí se mohou vytvořit vlásenky, které jsou pomocí RAG enzymů rozštěpeny a následně použity jako templáty pro adici palindromických (P) nukleotidů. Stejně tak může exonukleáza odstranit z konců kódujících segmentů různý počet nukleotidů, které pak terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT) doplní přidáním náhodných nukleotidů, které nejsou kódovány zárodečnou sekvencí DNA. DNA ligáza a polymeráza nakonec spojí volné konce, přičemž i polymeráza může přidat náhodné nukleotidy (Schelonka *et al.*, 2005).

2.3.1.1.2 V-DJ přeskupení genů pro těžký řetězec Ig

Podobným způsobem dochází také k přeskupení mezi V a D segmenty. Pokud je přeskupení genů na jednom chromozomu úspěšné a transkripce vzniká mRNA kódující funkční protein, zastaví se přeskupování imunoglobulinových genů na druhém chromozomu, což je označováno jako alelická exkluze. Protože nejbližším konstantním segmentem za VDJ přeskupením je μ segment, vznikají přepisem mRNA nejdříve těžké řetězce izotypu IgM. V tomto stádiu se B lymfocyty nazývají prekurzorové buňky (pre-B; Hořejší a Bartůňková, 2005).



Obr. 5: Přeskupování genů pro těžký řetězec imunoglobulinu, (upraveno podle http://www.talkdesign.org/faqs/evimmune/ei_figure005.jpg).

2.3.1.1.3 Pre-B receptor

Pre-B lymfocyty mají úspěšně přeskupené geny pro těžké řetězce imunoglobulinů, geny pro lehké řetězce však ještě přeskupené nejsou.

Místo pravých lehkých řetězců dochází v této fázi k tvorbě náhradních (pseudo) lehkých řetězců (ψ L) a to přepisem genů VpreB a λ 5. Na rozdíl od konvenčních lehkých řetězců neprochází V-preB ani λ 5 přeskupováním genů (Schroeder a Kirkham, 2000). B lymfocyt exprimuje na svém povrchu pre-B receptor (tvořený těžkým řetězcem a náhradním lehkým řetězcem), který asociuje s dimerem signalizačních proteinů Iga - Ig β (CD79 α , CD79 β). Pomocí tohoto signalizačního komplexu přijímá buňka signály k zahájení přeskupování genů pro lehké řetězce (Hořejší a Bartůňková, 2005).

2.3.1.1.4 Přeskupování genů pro lehké řetězce imunoglobulinů

Nejprve je zahájeno přeskupování genů pro lehký řetězec κ , které probíhá na obou chromozomech, dokud není vytvořen funkční lehký řetězec. Pokud není přeskupování genů pro κ řetězec úspěšné, zahájí se přeskupování genů pro řetězec λ . Jestliže ani přeskupením těchto genů nevzniká funkční lehký řetězec, hyne pre-B

lymfocyt apoptózou (Hořejší a Bartůňková, 2005). V opačném případě lehký řetězec vytěsňuje ψL z vazby s těžkým řetězcem a vzniká pravý BCR (Schroeder a Kirkham, 2000). Buňka exprimuje tento receptor na svém povrchu jako membránové IgM a přechází do stádia nezralého B lymfocytu.

V tomto okamžiku jsou všechny buňky nesoucí BCR, který rozeznává antigeny vlastního organismu podrobeny negativní selekci, která může vést k několika událostem. Autoreaktivní B lymfocyt se může pokusit přeskupit imunoglobulinové geny na druhém chromozomu (editování receptoru; Chung *et al.*, 2003). Často také dochází k buněčné smrti lymfocytu apoptózou nebo k indukci klidového stádia, tzv. anergie (Heltemes a Manser, 2002). Ve stavu anergie periferní B lymfocyty nereagují na stimulaci antigenem, neproliferují, ani nesekretují protilátky (Merrell *et al.*, 2006).

2.3.1.2 Periferní vývoj B lymfocytů

B lymfocyty, které projdou negativní selekcí, opouštějí kostní dřeň a migrují jako tzv. transientní buňky krevním řečištěm do sekundárních lymfoidních orgánů, zejména do sleziny a lymfatických uzlin, kde dochází k jejich dalšímu dozrávání do stádia zralého lymfocytu (mature B lymphocyte; Carsetti *et al.*, 2000).

2.3.1.2.1 Transientní buňky

Ve stádiu transientních buněk jsou B lymfocyty krátce žijící a funkčně nezralé. Tato populace je charakterizována vysokou hustotou exprese povrchových molekul IgM, CD24 a CD38. Dále exprimují transientní buňky na svém povrchu také molekuly CD21, CD23 a CD62L (L-selektin; Carsetti, 2004).

Podle fenotypu a funkčních charakteristik je možné rozdělit transientní B buňky do dvou subpopulací – T1 a T2. T1 lymfocyty jsou $IgM^{high}IgD^{-}CD21^{low}CD23^{-}$. T2 buňky jsou rovněž IgM^{high} , ale dále pak $IgD^{+}CD21^{+}CD23^{+}$ (Loder *et al.*, 1999). T1 buňky migrují z kostní dřeně krví do sleziny a lymfatických uzlin, zatímco výskyt T2 buněk je omezen pouze na slezinu. Při signalizaci přes BCR T1 buňky hynou apoptózou, naopak T2 buňky proliferují, diferencují se a zvětšují svou velikost (Chung *et al.*, 2002).

Někteří autoři rozlišují ještě třetí transientní stádium – T3, které se liší od T2 nižší expresí povrchového IgM (Allman *et al.*, 2001). Tato populace se fenotypově velmi podobá buňkám ve stádiu anergie a zatím není zcela jasné, zda se opravdu jedná

o transientní buňky anebo o anergizované autoreaktivní B lymfocyty (Merrell *et al.*, 2006).

2.3.1.2.2 Folikulární buňky

T2 buňky migrují do primárních lymfoidních folikulů sleziny, kde se diferencují ve zralé, dlouho žijící folikulární buňky. Tyto B lymfocyty se doposud neseťkaly s antigenem, a proto se označují jako naivní.

Populace naivních folikulárních buněk aktivně recirkuluje mezi sekundárními lymfoidními orgány (von Andrian a Mempel, 2003). Pokud v některém lymfoidním orgánu narazí naivní B buňky na antigen, který dokážou rozeznat svými receptory (BCR), usídlí se zde a za spolupráce T lymfocytů a folikulárních dendritických buněk (FDC, follicular dendritic cells) vytváří germinální centra (MacLennan, 1994).

V těchto vysoce specializovaných strukturách dochází díky antigenní stimulaci k somatické hypermutaci genů pro imunoglobuliny, izotypovému přesmyku a afinitní maturaci doprovázené masivní klonální expanzí B lymfocytů. Tyto procesy vedou ke zvýšení afinity protilátky k antigenu. Pro další vývoj jsou pak vybírány pouze B lymfocyty, které rozeznají antigen s nejvyšší afinitou, zatímco ostatní B buňky hynou apoptózou (afinitní maturace). Následně se folikulární buňky diferencují v plasmatické buňky sekretující protilátky anebo v dlouho žijící izotypově přepnuté paměťové B lymfocyty (Carsetti *et al.*, 2004).

2.3.1.2.3 Buňky marginální zóny

Část buněk nevstupuje do folikulů, ale zůstává v marginální zóně (MZ), což je specializovaná oblast na rozhraní bílé a červené pulpy sleziny. V marginální zóně neprocházejí B buňky antigenem indukovanou somatickou hypermutací ani izotypovým přesmykem, ale dozrávají v tzv. IgM paměťové B lymfocyty. Podle exprese povrchových molekul se jedná o $IgM^+IgD^+CD27^+$ subpopulaci B lymfocytů. I když se tyto buňky vyvíjejí mimo germinální centra a tedy ani neprocházejí somatickou hypermutací, jsou jejich geny pro variabilní části imunoglobulinových řetězců mutované. Somatické mutace získávají tyto buňky zřejmě již během časné ontogeneze, nezávisle na stimulaci antigenem, není však jasné, ve kterém lymfoidním orgánu k tomu dochází (Weller *et al.*, 2004). IgM paměťové buňky tvoří důležitou část obrany proti TI

(T-independent, T-nezávislý) antigenům, jako jsou polysacharidové antigeny obalených bakterií (Dunn-Walters *et al.*, 1995).

2.3.1.2.4 Somatická hypermutace

Somatická hypermutace (SHM) je proces genetické diversifikace, kterým vznikají substituce nukleotidů ve variabilních oblastech Ig genů lehkých i těžkých řetězců (Neuberg a Rada, 2006, obr. 6). Mutace vznikají ve 3 lokusech na chromosomech 2, 14 a 22 v oblastech o délce asi 2 kb, které zahrnují přeskupené geny pro imunoglobuliny a jejich přilehlé introny (Martomo a Gearhart, 2006). Během somatické hypermutace dochází jak transicím (vzájemné záměny purin-purin, pyrimidin-pyrimidin) tak k transverzím (záměny purin-pyrimidin, pyrimidin-purin). K mutacím dochází v C/G i A/T párech, avšak mechanismy jejich vzniku se liší. Modely vzniku SHM zahrnují chyby DNA polymerázy, nepřesnosti během replikace chromozomů a mutace vzniklé během oprav chybného párování bazí (Seki *et al.*, 2005).

2.3.1.2.4.1 Mechanismy vzniku somatických hypermutací

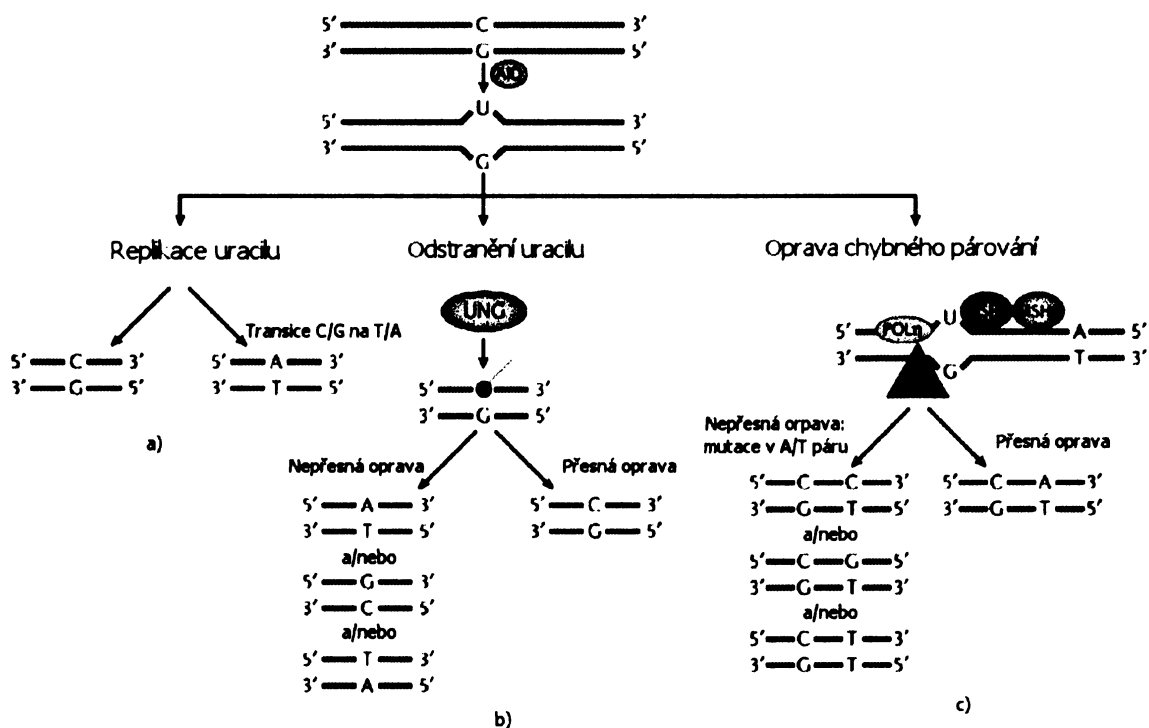
Celý proces je zahájen aktivací indukovanou cytidin deaminázou (activation induced cytidin deaminase, AID). Tento enzym je exprimován pouze v B lymfocytech a zavádí mutace rychlostí asi 10^{-3} na jeden pár bazí za jedno buněčné dělení (Di Noia a Neuberger, 2007). AID deaminuje cytosin na uracil, přičemž velmi preferuje cytosiny v motivech WRC (W=A/T, R=A/G) v jednovláknové (single strand DNA, ssDNA), která přechodně vzniká během transkripce imunoglobulinových genů (Barreto *et al.*, 2005).

Deaminací cytosinu vznikají místo C/G páru, U/G páry (Neuberg a Rada, 2006). Přítomnost uracilu v DNA spouští opravné mechanismy, vedoucí k jeho odstranění a nahrazení správnou bází. V lidských buňkách je uracil z DNA obvykle odstraněn enzymem uracil-DNA glykosylázou, čímž vzniká abasické místo, které je pak rozštěpeno a opraveno. Mutace vznikají, pokud je toto poškozené místo opraveno nepřesnou (low-fidelity) polymerázou, která vloží na místo původního cytosinu jinou bázi (Seki *et al.*, 2005, obr 6b). Pokud se abasické místo objeví v DNA během její replikace, replikační aparát se na něm zastaví. K abasickému místu jsou naváděny specializované polymerázy, které dokážou přidávat nukleotidy do nově rostoucího vlákna DNA, i když nemají potřebný templát. Replikace tedy může pokračovat, dochází

však ke změně C/G páru na jiný, podle toho, jaký nukleotid konkrétní polymeráza začlenila do rostoucího vlákna DNA (Neuberg a Rada, 2006).

Během replikace chromosomu může také dojít ke zkopírování uracilu vysoce přesnou polymerázou, která vloží A naproti U, čímž dojde k transici C na T (Seki *et al.*, 2005, obr. 6a).

Mechanismus vzniku mutací v A/T párech je méně přímočarý a méně jasný. Celý proces je rovněž zahájen AID katalyzovanou deaminací cytosinu na uracil, není však jejím přímým důsledkem. Na pár U/G se váže heterodimer proteinů MSH2-MSH6 (MutS homology), jehož funkcí je oprava chybného párování bází, a dále také exonukleáza 1, která během replikace odstraňuje nukleotidy z Okazakiho fragmentů opožděujícího se vlákna DNA ve směru 5'-3' (Martomo a Gearhart, 2006). Takto vzniklé mezery jsou dosyntetizovány nepřesnou DNA polymerázou η , čímž vznikají transice i transverze původního A/T páru. (Wilson *et al.*, 2005, obr. 6c).



Obr. 6: Mechanismy vzniku somatických hypermutací.

(Upraveno podle: <http://www.nature.com/nri/journal/v6/n8/images/nri1896-f2.jpg>)

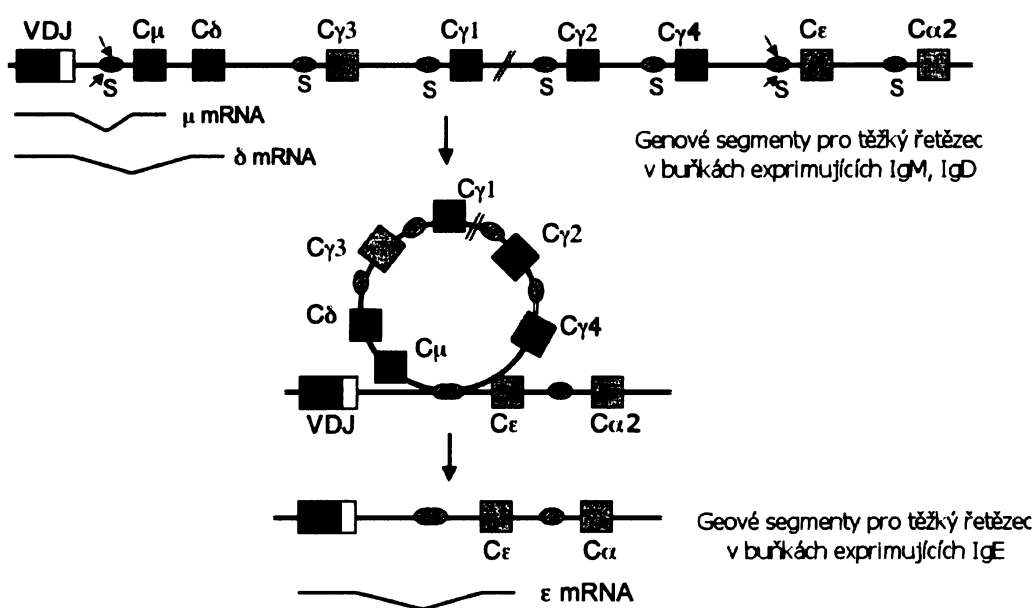
2.3.1.2.5 Izotypový přesmyk

Dalším procesem, kterým procházejí B lymfocyty po stimulaci antigenem v germinálních centrech je izotypový přesmyk. Při izotypovém přesmyku dochází k rekombinaci konstantních oblastí imunoglobulinových genů pro těžké řetězce tak, aby buňky mohly místo prvotního IgM tvořit další izotypy protilátek se specializovanými funkcemi (obr. 7).

2.3.1.2.5.1 Mechanismus izotypového přesmyku

Introny oddělující geny pro konstantní oblasti těžkých řetězců (kromě intronu před C δ) obsahují tzv. switch (S) sekvence. Jednotlivé S sekvence se liší v délce i konkrétní sekvenci, všechny však obsahují pentamerické tandemové repetice GAGCT a GGGCT (Pan-Hammarström *et al.*, 2007).

Stejně jako somatická hypermutace, tak i izotypový přesmyk je zahájen AID, která deaminuje cytosiny v S sekvencích na uracily. Za spolupráce dalších enzymů a proteinů vedou tyto mutace k dvouvláknovým zlomům DNA (Stavnezer *et al.*, 2008). Přítomnost takto poškozené DNA je pro buňku stresující situací, a proto se snaží zlomy opravit. Existují dva základní mechanismy opravy dvouvláknových zlomů DNA – homologní a nehomologní (Kotnis *et al.*, 2009). Při izotypovém přesmyku se uplatňuje nehomologní spojení konců DNA a úsek DNA mezi těmito konci je z chromozomu odstraněn. Vzdálenější gen pro konstantní oblast těžkého řetězce se tak dostává do blízkosti přeskupeného V genu (Nagaoka *et al.*, 2002). Transkripcí genu pro variabilní část imunoglobulinu s přilehlým genem pro konstantní oblast vzniká funkční mRNA, jejíž translací vznikají těžké řetězce příslušného izotypu. Důležitou roli při izotypovém přesmyku hrají intracelulární cytokiny, které celý proces regulují a rozhodují o konkrétním izotypu Ig, který bude B buňkou tvořen.



Obr. 7: Mechanismus izotypového přesmyku. Šipky naznačují místa vzniku dvouvláknových zlomů indukovaných AID.

Upraveno podle: <http://www.umassmed.edu/faculty/graphics/300/Slide0001.jpg>.

2.3.1.2.6 Paměťové buňky

Výsledkem procesů stimulovaných v germinálních centrech je diferenciace paměťových a plasmatických buněk (obr. 8).

Paměťové buňky recirkulují mezi periferními lymfoidními orgány a kostní dření (Paramithiotis a Cooper, 1997). Charakteristickým znakem paměťových buněk je exprese povrchové molekuly CD27 a přítomnost somatických mutací ve variabilních částech imunoglobulinových genů. Fenotyp paměťových buněk, které se diferencovaly v germinálních centrech, kde prošly izotypovým přemýkem, je tedy $IgM^-IgD^-CD27^+$ (Klein *et al.*, 1998). Izotypově přepnuté paměťové buňky se při opakovaném setkání organismu se stejným antigenem, který stimuloval jejich vývoj, rychle aktivují a diferencují v plasmatické buňky sekretující protilátky. Imunitní odpověď organismu je tedy rychlejší a účinnější (Klein *et al.*, 1997).

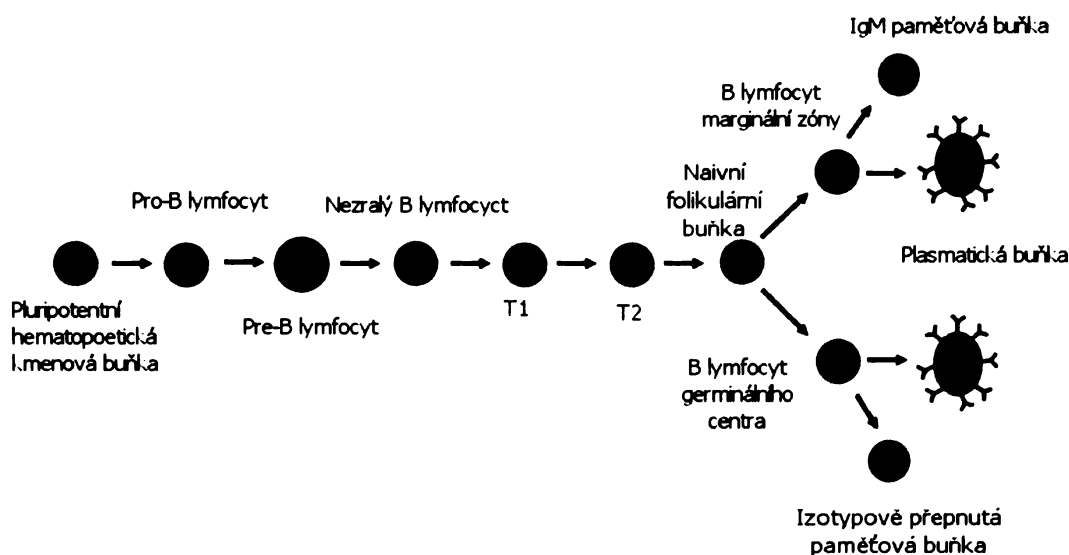
Další B buněčná populace v periferní krvi, která nese fenotyp paměťových buněk, je odvozena z buněk marginální zóny. Jedná se o $IgM^+IgD^+CD27^+$ B lymfocyty, které, přestože neprošly germinálními centry, mají mutované geny pro variabilní oblasti imunoglobulinových řetězců (Weller *et al.*, 2008, Schereen *et al.*, 2008). Na rozdíl od klasických paměťových buněk, jejichž aktivita je zaměřena zejména proti proteinovým

antigenům, IgM paměťové B lymfocyty rozeznávají spíše polysacharidové antigeny a spouštějí imunitní reakce nezávislé na pomoci T lymfocytů (Klein *et al.*, 1998).

2.3.1.2.7 Plasmatické buňky

Plasmatické buňky se diferencují jednak z folikulárních buněk a buněk marginální zóny, ale také z dlouho žijících paměťových buněk. Hlavní funkcí plasmatických buněk je tvorba a sekrece imunoglobulinů, které pak cirkulují periferní krví a specificky se vážou na antigen, jenž prvotně stimuloval jejich diferenciaci. K aktivaci plasmatických buněk je zapotřebí dalších signálů, zejména prostřednictvím T lymfocytů a cytokinů (Agematsu *et al.*, 1998).

Plasmatické buňky obvykle žijí jen krátkou dobu a po splnění svých funkcí hynou. Byla však popsána také existence dlouho žijících plasmatických buněk osidlujících kostní dřeň, jejichž fyziologický význam zatím není zcela objasněn (Arce *et al.*, 2004). U autoimunitních onemocnění jsou tyto dlouho žijící plasmatické buňky odpovědné za tvorbu autoprotilátek. Léčba v těchto případech není jednoduchá, jelikož jsou tyto buňky rezistentní ke klasickým způsobům léčby imunosupresivy a anti-B buněčné (anti-CD20) terapii (Hoyer *et al.*, 2005).



Obr. 8: Diferenciace B lymfocytu.

2.3.1.3 B lymfocyty v periferní krvi

Periferní krvi člověka cirkuluje řada subpopulací B lymfocytů, které lze identifikovat podle exprese povrchových molekul, tzv. CD antigenů (cluster differentiation, tab. 1). Až 60% periferních B lymfocytů tvoří subpopulace naivních B buněk s fenotypem CD27⁻ a zhruba 40% pak subpopulace paměťových buněk, které CD27 exprimují (CD27⁺; Klein *et al.*, 1997).

Mezi naivní stádia B lymfocytů jsou zahrnovány také transientní buňky, které se dělí do dvou, podle některých autorů do 3 subpopulací (Loder *et al.*, 1999, Allman *et al.*, 2001). Hlavní frakcí CD27⁻ buněk je populace naivních folikulárních buněk, které exprimují CD23, CD21, IgM a IgD (Warnatz a Schleiser, 2008).

Přibližně polovina paměťových buněk jsou izotypově přepnuté B lymfocyty exprimující jiné povrchové imunoglobuliny než IgM a IgD (fenotyp IgM⁻IgD⁻CD27⁺). Druhou polovinu pak tvoří IgM paměťové buňky s fenotypem IgM⁺IgD⁺CD27⁺. Velmi zřídka mohou být v periferní krvi detekovány také další subpopulace paměťových buněk, které exprimují jen IgM nebo jen IgD (Klein *et al.*, 1998). Plasmatické buňky necirkulují v krevním oběhu, jejich prekurzory (plasmablasty) však lze v malém množství detekovat v periferní krvi podle vysoké hustoty povrchových molekul CD38 a CD27 (Bernasconi *et al.*, 2002, Avery *et al.*, 2003).

Populace B lymfocytů	Povrchový marker						
	CD27	IgM	IgD	CD21	CD23	CD24	CD38
T1	-	+++	-	-	-	+++	+++
T2	-	+++	+	+++	+	+++	+++
T3	-	+	+	+	+	nd	nd
Naivní folikulární	-	+	+	+	+	+	+
Izotypově přepnuté paměťové	+	-	-	+	-	++	+/-
IgM paměťové	+	+++	+	+++	+/-	++	++
Plasmablasty	+++	-(+)	-(+)	+/-	-	-	+++

Tab. 1: Expese vybraných povrchových markerů na populacích periferních B lymfocytů. Míra exprese je znázorněna znaménky: - (marker není exprimován), +/- (slabá exprese), + (běžná exprese), ++ (silná exprese), +++ (velmi silná exprese), nd (nedefinováno). Sestaveno podle Warnatz a Schleiser, 2008, Chung *et al.*, 2003, Allman *et al* 2004, Vlková, 2008.

2.3.1.4 Markery B buněčných populací

Jak bylo výše uvedeno, jednotlivá vývojová stádia B lymfocytů exprimují na svém povrchu různé membránově vázané molekuly, CD antigeny. Jedná se o signalizační molekuly a komplexy, receptory, ligandy a další molekuly. Pomocí těchto molekul přijímá B buňka signály určující její další vývoj, ale také sama předává signály svému okolí. Povrchové molekuly B lymfocytů se využívají jako markery, díky kterým lze jednotlivé populace identifikovat a separovat od ostatních. Dále jsou uvedeny pouze ty CD antigeny, které jsou relevantní k zaměření a tématu diplomové práce. Úplný seznam CD antigenů je dostupný např. na webových stránkách prowww.nci.nih.gov.

2.3.1.4.1 CD19

Molekula CD19 je markerem celé B buněčné linie, tzv. panB marker. Na svém povrchu ji exprimují již časná stádia B lymfocytů v kostní dřeni a B buňky pokračují v její expresi až do stádia paměťových buněk a plasmablastů. Během zrání plasmatických buněk její exprese mizí (Sato *et al.*, 1995).

CD19 spolu s molekulami CD21, CD81 a CD225 vytváří signalizační komplex, který pozitivně nebo negativně reguluje signály přenášené BCR. Funkcí podjednotky CD19 v tomto koreceptoru je aktivace signalizačních kaskád po vazbě ligandu na CD21.

Signály zprostředkované CD19 jakož i celým koreceptorem BCR jsou nezbytné pro vývoj, aktivaci a diferenciaci B lymfocytů (Carter a Fearon, 1992).

2.3.1.4.2 CD21

Exprese receptoru C3d neboli CD21 se poprvé objevuje u transientních stádií B lymfocytů. Transientní buňky exprimují jen malé množství CD21, s postupným dozráváním B lymfocytu se však exprese CD21 zvyšuje. Vysokou hustotu CD21 na svém povrchu mají zejména B lymfocyty marginální zóny. S vývojem plasmatických buněk exprese CD21 ustává. CD21 je také součástí koreceptoru BCR a jeho funkcí v tomto komplexu je vazba C3d(g) fragmentu komplementu a aktivace B lymfocytu (Fearon a Carroll, 2000).

2.3.1.4.3 CD24

Membránový glykoprotein CD24 je exprimován na většině vývojových stádií B lymfocytů, během diferenciaci plasmatických buněk však jeho exprese ustává. Molekula CD24 přenáší signály, které regulují odpověď B buňky na aktivační signály (Kay *et al.*, 1991) a mohou indukovat její apoptózu (Suzuki *et al.*, 2001).

2.3.1.4.4 CD27

Molekula CD27 patří do rodiny TNF receptorů (tumor necrosis factor, faktor nekrotizující nádory). B lymfocyty začínají exprimovat CD27 receptor při svém vývoji v geminálních centrech a pokračují v jeho expresi až do konečných diferenciacních stádií. Ligandem CD27 je molekula CD70 exprimovaná na T lymfocytech. Signalizace přes CD27 na paměťových B lymfocytech stimuluje jejich diferenciaci na plasmatické buňky (Agematsu *et al.*, 1999).

2.3.1.4.5 CD38

Molekula CD38 je exprimována na B lymfocytech zejména během jejich časné diferenciaci a aktivace. Vysokou hustotu CD38 mají na svém povrchu zejména plasmatické buňky (Medina *et al.*, 2002).

Glykoprotein CD38 funguje jako enzym katalyzující řadu buněčných reakcí, které podle okolního prostředí pozitivně i negativně regulují aktivaci a proliferaci buněk (Malavasi, *et al.*, 1994). Signalizace přes CD38 B lymfocyty germinálního centra může zabránit apoptóze těchto buněk. Naopak u prekurzorů B lymfocytů v kostní dřeni vede signalizaci přes CD38 k inhibici proliferace a následné apoptóze (Shubinsky a Schlesinger, 1997).

Protože tato molekula funguje jako enzym a zároveň jako povrchový receptor a navíc se vyskytuje také v jaderné membráně, nejsou všechny aspekty její funkce plně pochopeny (Malavasi *et al.*, 1994).

2.4 Běžný variabilní imunodeficit (common variable immunodeficiency, CVID)

Běžný variabilní imunodeficit (common variable immunodeficiency, CVID) je nejčastějším syndromem primární deficiencie protilátek.

Primární imunodeficiencie (ID) představují velmi heterogenní skupinu nemocí, jejichž příčinou jsou vrozené a většinou také dědičné defekty některé složky adaptivní nebo neadaptivní imunity (Di Renzo *et al.*, 2004).

CVID je charakterizována opakovanými bakteriálními infekcemi, hlavně horních a dolních cest dýchacích, a je také spojena se zvýšeným výskytem autoimunitních poruch a neoplastických onemocnění. Nemoc postihuje stejně často muže i ženy a její výskyt u evropské populace je asi 1:25.000 (Bacchelli *et al.*, 2007), může se však pohybovat mezi 1:10.000 až 1:200.000 (Di Renzo *et al.*, 2004, Kokron

et al., 2004). Nemoc je překvapivě velmi vzácná mezi asijskou populací, kde je její prevalence 1:2.000.000 (Kokron *et al.*, 2004).

2.4.1 Diagnóza

Diagnostická kritéria pro CVID jsou stanovena Evropskou společností pro imunodeficiencie (European Society for Immunodeficiencies, ESID) takto:

- výrazně snížená koncentrace sérového IgG a jednoho z izotypů IgA nebo IgM, a to více než dvě standardní odchyly pod průměrnými hodnotami pro danou věkovou skupinu
- výskyt nemoci až po druhém roce života
- pacientům chybí isohemaglutininy a/nebo imunitní odpověď (tvorba protilátek) na očkování je nedostatečná
- jiné příčiny hypogamaglobulinemie byly vyloučeny (esid.org/workingparty.php?party=3&sub=2&id=73, Kokron *et al.*, 2004)

2.4.2 Klinické projevy

Spektrum klinických příznaků CVID je velmi široké, a může se projevit kdykoli po druhém roce života. Imunodeficiencie u CVID pacientů často není zjevná během prvních let života. Nemoc je nejčastěji diagnostikována v pubertě, s vrcholem mezi 13. a 30. rokem. Symptomy se však mohou projevit až mnohem později, a některé případy jsou diagnostikovány až po 65. roce života (Kokron *et al.*, 2004, Warnatz a Schleiser, 2008).

Mezi klinické projevy téměř u všech pacientů patří větší náchylnost k bakteriálním infekcím horních a dolních dýchacích cest, opakované záněty dutin a průdušek a zápalý plic způsobené zejména bakteriemi *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* (Di Renzo *et al.*, 2004).

Asi 60% pacientů trpí před zahájením léčby průjmem, který může být způsoben různými infekčními mikroorganismy jako *Giardia lamblia* nebo *Salmonella*, *Shigella* či *Campylobacter*. Časté jsou také záněty střeva, zejména tlustého. Přibližně u 5% pacientů se objevuje infekce *Mycoplasmaty* v močových cestách, výjimečně se systémovým rozšířením a hlubokými abscesy (Di Renzo *et al.*, 2004).

S onemocněním CVID, stejně jako s jinými primárními ID je spojen vyšší výskyt lymfoproliferativních chorob. U CVID pacientů jsou častější benigní lymfoproliferativní choroby než maligní lymfomy. 30% pacientů je postiženo

splenomegalií nebo lymfadenopatií (Bacchelli *et al.*, 2007). Pacienti mají také 50x větší náchylnost k vývoji rakoviny žaludku, než zdraví jedinci.

U 8-22% pacientů byl popsán granulomatózní syndrom. Granulomy mohou být prvním příznakem defektu imunitního systému (IS). Vznikají v plicích, kůži, játrech, kostní dřeni a lymfatických uzlinách. Jejich výskyt koreluje s výskytem splenomegalie a s vývojem autoimunitních chorob. Uvedené symptomy se mohou objevit a zmizet nezávisle na léčbě.

Autoimunitní choroby jsou diagnostikovány asi u 22% pacientů. Autoimunitou může být postižen jakýkoli orgán, nejčastěji jsou autoprotilátkami napadány krevní destičky, červené krvinky a někdy také neutrofilové. U pacientů s CVID dochází k rozvoji některých autoimunitních chorob jako revmatoidní artritida (RA), systémový lupus erythematosus (SLE) a vaskulitida (zánět cév). V těchto případech léčba není jednoduchá, protože obvykle používaná imunosupresiva ještě více tlumí již deficientní imunitní systém, a tedy vlastně zvyšují nebezpečí infekcí (Di Renzo *et al.*, 2004).

2.4.2.1 Imunologický obraz CVID pacientů

CVID je velmi heterogenní onemocnění, a na úrovni imunitního systému se projevuje řadou patologických změn funkcí humorální i buněčné imunity.

2.4.2.1.1 Humorální imunita

Hlavními znaky onemocnění CVID jsou abnormality postihující B buněčné subpopulace. Počet cirkulujících B lymfocytů v periferní krvi pacientů je většinou normální, může však být také snížený. B lymfocyty mají narušenou proliferaci, diferenciaci, odpověď na stimulaci antigenem a sekreci imunoglobulinů. Někteří pacienti mají zvýšenou frekvenci nezralých B lymfocytů v periferní krvi. Často je také snížená frekvence CD27⁺ paměťových B buněk a narušen izotypový přesmyk do IgG a IgA sekretujících buněk. Některým pacientům zcela chybí paměťové IgM B lymfocyty, což je provázeno špatnou imunitní odpovědí na polysacharidové antigeny (Bacchelli *et al.*, 2007).

2.4.2.1.2 Buněčná imunita

Až 50% pacientů s CVID má narušenou buněčnou imunitu, což znamená, že nedostatečná produkce imunoglobulinů může být způsobena mimo jiné defektní pomocí ze strany T buněk a regulačních T buněk nebo špatnou funkcí supresorových T lymfocytů (Kokron *et al.*, 2004).

T lymfocyty pacientů mají rovněž sníženou schopnost proliferace a aktivace, narušenou odpověď na stimulaci antigenem a sníženou schopnost tvorby cytokinů IL-2, IL-4, IL-6 a IL-10. Někteří pacienti mají zvýšenou frekvenci CD8⁺ T lymfocytů a zároveň sníženou frekvenci CD4⁺ T buněk, což vede k obrácení poměru CD4⁺/CD8⁺ (Di Renzo *et al.*, 2004). Exprese CD40L aktivovanými T buňkami může být u pacientů s CVID nižší, ve srovnání se zdravými kontrolami (Kokron *et al.*, 2004).

Monocyty a makrofágy CVID pacientů jsou obvykle aktivované. Makrofágy navíc produkují velké množství IL-12, který může indukovat posun imunitní odpovědi směrem k Th1 (Di Renzo *et al.*, 2004).

2.4.2.2 Etiopatogeneze CVID

První případ onemocnění CVID byl diagnostikován již v roce 1953. Přesto však základní podstata této nemoci zůstává stále neobjasněna (Kokron *et al.*, 2004). V poslední době bylo popsáno několik monogeních defektů (viz dále), souvisejících s rozvojem CVID, avšak dědičnost onemocnění je velmi variabilní a byla prokázána asi u 20% případů.

Většina rodin, ve kterých se CVID vyskytuje vícekrát, vykazuje autozomálně dominantní typ dědičnosti, ale v menšině případů se také prokazatelně vyskytuje autozomálně recesivní dědičnost (Hammarström *et al.*, 2000). Častý je současný výskyt CVID a IgA deficiencie (IgAD) v jedné rodině. Navíc někteří pacienti mohou přecházet z IgAD do CVID fenotypu (Aghamohammadi *et al.*, 2008).

Částečně jsou za predispozice k onemocnění CVID zodpovědné některé HLA (human leukocyte antigens, lidské leukocytární antigeny) alely. Hlavním lokusem souvisejícím s predispozicí pro CVID je pravděpodobně HLA-DQ/DR (Kralovicova *et al.*, 2003). Byla také zjištěna souvislost mezi homozygotní kompozicí genů kódujících molekuly HLA II třídy, hlavně HLA-DQ a onemocněním CVID (De La Concha *et al.*, 1999). Navíc se u CVID pacientů často objevují haplotypy zahrnující oblast mezi HLA-DQB1 a HLA-A (Schroeder, 2000).

Monogenní defekty, které prokazatelně vedou k onemocnění CVID zodpovídají pouze za 10-15 % všech případů CVID, u zbývajících pacientů tyto defekty pozorovány nejsou. Jedná se o mutace v genech kódujících TACI (transmembrane activator and CAML interactor, transmembránový aktivátor interagující s CAML; calcium-modulating ligand, ligand regulující vápník), CD19 (diferenční marker B buněčné

linie) a ICOS (inducible co-stimulator molecule, indukovatelná kostimulační molekula; Bacchelli *et al.*, 2007).

2.4.2.2.1 TACI deficiency

TACI je exprimován na všech lidských periferních B lymfocytech, zejména pak na pozdních transientních B buňkách a B lymfocytech marginální zóny. TACI funguje jako receptor, na který se váží ligandy BAFF (B cell activating factor, B buněčný aktivační faktor) a APRIL (a proliferation-inducing ligand, proliferaci indukující ligand). Signalizace přes TACI negativně reguluje vývoj B lymfocytů a je důležitá pro izotypový přesmyk do IgA (Schneider 2005). Bylo popsáno několik typů mutací v genu pro TACI (inzerce, substituce), jež mají za následek vznik nefunkčního proteinu a narušení signalizace přes tento receptor (Salzer *et al.*, 2005, Garibyan 2007). Mutace v genu pro TACI jsou nalezeny u 8-10% případu CVID pacientů (Bacchelli *et al.*, 2007).

2.4.2.2.2 CD19 deficiency

Molekula CD19 tvoří spolu s proteiny CD21, CD81 a CD225 koreceptor BCR, který přenáší do B buňky negativní i pozitivní signály, v závislosti na vazbě antigenu na receptor. U několika pacientů byly popsány bodové mutace v genu pro CD19 (inzerce a delece), které měly za následek změnu čtecího rámce a tedy tvorbu nefunkčního proteinu. Tito pacienti mají normální počet periferních B lymfocytů, exprese CD19 na B buňkách je však buď jen stěží detekovatelná, nebo na povrchu buněk zcela chybí. V důsledku toho má nedostatečná signalizace přes CD19 za následek slabou odpověď B buněk na stimulaci antigenem a narušenou tvorbu protilátek (van Zelm *et al.*, 2006).

2.4.2.2.3 ICOS deficiency

Indukovatelná kostimulační molekula je exprimována jen na aktivovaných T lymfocytech. Její hlavní funkcí je indukce sekrece cytokinů a interleukinů, a to zejména IL-10, který stimuluje terminální diferenciaci B lymfocytů do paměťových a plazmatických buněk (Hutloff *et al.*, 1999). Deficience ICOS u člověka je způsobena posunem čtecího rámce v genu kódujícím ICOS, takže výsledný protein je zkrácený o 28 aminokyselin (AMK), a nemůže být exprimován na T lymfocytech (Bacchelli *et al.*, 2007).

Pacienti s deficiencí ICOS mají snížené celkové množství B buněk, s významným snížením CD27⁺IgM⁻IgD⁻ izotypově přepnutých paměťových buněk a také naivních CD27⁻IgM⁺IgD⁺ buněk. Proces izotypového přesmyku je výrazně narušen, zatímco somatické hypermutace nejsou ovlivněny. Dále je u ICOS deficientních pacientů narušená tvorba germinálních center, a germinální reakce vůbec neprobíhá (Grimbacher *et al.*, 2003).

2.4.2.3 Léčba

Dříve byli pacienti léčeni intramuskulárními injekcemi imunoglobulinů, přestože tato léčba byla bolestivá. Navíc adekvátní hranice sérových Ig nebylo dosaženo a infekcím často nebylo zabráněno. V roce 1981 byla v USA zavedena léčba intravenózní imunoglobulinovou substitucí (intravenous immunoglobulins, IVIG), jako vylepšená, méně bolestivá alternativa k intramuskulárním Ig (Thampakkul a Ballow, 2001).

Množství podávaných imunoglobulinů se pohybuje od 300 do 600 mg/kg každé 3-4 týdny. 4 týdny po infúzi se hladina Ig významně snižuje, protože poločas rozpadu Ig je asi 15-25 dní a imunoglobuliny jsou rychle transportovány do tkání. U terapie vyššími dávkami Ig (500-600 mg/kg) se jejich průměrná hladina zvyšuje a po 4-8 měsících pravidelných infuzí je dosaženo stabilizované hladiny. Tyto vysoké dávky IVIG jsou provázeny menším počtem a lehčím průběhem infekcí, sníženou frekvencí a počtem dnů hospitalizace a méně dny léčby antibiotiky. IVIG jsou obvykle dobře tolerovány, avšak někteří pacienti si stěžují na únavu, nevolnost, zvracení, zimnici a horečku. Tyto vedlejší účinky jsou častější u pacientů léčených poprvé nebo u pacientů s doprovodnými infekcemi (Di Renzo *et al.*, 2004).

2.4.2.3.1 Klasifikace CVID pacientů

Heterogenita onemocnění CVID vyvolala potřebu rozdělit pacienty do skupin se společnými znaky. Kritériem klasifikace se staly změny ve frekvencích B lymfocytárních subpopulací. Celkem existují 3 klasifikace: 2 starší (Freiburgská a Pařížská) a nejnovější tzv. klasifikace EURO (Wehr *et al.*, 2007).

Freiburgská klasifikace dělí pacienty do 3 skupiny podle exprese povrchových molekul IgM, IgD, CD27, CD21 na periferních B lymfocytech.

Pacienti skupiny I mají méně než 0,4% izotypově přepnutých IgD⁻IgM⁻CD27⁺ paměťových B lymfocytů a dále se podle frekvence CD21^{low} buněk dělí na podskupiny Ia (CD21^{low} B buňky tvoří více než 20% B lymfocytů.), a Ib (normální množství

CD21^{low} B buněk). Skupina II sdružuje pacienty s normálním množstvím izotypově přepnutých paměťových buněk (Warnatz *et al.*, 2002).

Kritériem Pařížské klasifikace jsou změny ve frekvenci populace paměťových B lymfocytů. Pacienti jsou rovněž rozděleni do 3 skupin. Pro pacienty skupiny MB0 je typické snížení všech CD27⁺ buněk pod 11%. Skupina MB1 sdružuje pacienty se selektivní redukcí izotypově přepnutých IgD⁻IgM⁻CD27⁺ paměťových B buněk pod 8%. Frekvence všech CD27⁺ lymfocytů u této skupiny je však vyšší než 11%. Do skupiny MB2 jsou zařazeni pacienti, kteří nesplňují kritéria skupiny MB0 ani MB1 (Piqueras *et al.*, 2003).

2.4.2.3.2 EURO klasifikace

Za účelem sjednocení obou klasifikačních schémat vznikla velká celoevropská studie. Jejím cílem bylo vyšetření většího počtu evropských pacientů a hledání korelací klinických parametrů s klasifikačními kritérii. V rámci studie byla provedena analýza B lymfocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie u více než 300 pacientů s CVID a na jejím základě byla vytvořena nová klasifikace pacientů. Kritériem rozdělení CVID pacientů se staly změny ve frekvenci izotypově přepnutých paměťových buněk, transientních buněk a CD21^{low} buněk (tab. 2; Wehr *et al.*, 2007).

Nejprve jsou pacienti rozděleni podle frekvence všech B lymfocytů do skupiny B+ (více než 1% B lymfocytů) a B- (méně než 1% B lymfocytů). Skupina B+ se dále dělí podle počtu izotypově přepnutých paměťových B buněk na skupinu smB- (frekvence izotypově přepnutých buněk je méně nebo rovna 2%) a smB+ (frekvence izotypově přepnutých buněk je větší než 2%). Podle absolutní i relativní frekvence transientních buněk se skupina smB- dělí na dvě další. Zvýšený počet transientních buněk mají pacienti smB-Tr^{hi} (rovno nebo více než 9% transientních buněk), zatímco pacienti skupiny smB-Tr^{nom} mají normální počet transientních buněk (pod 9%). Skupiny smB+ a smB- se dále dělí podle frekvence CD21^{lo} B buněčné populace na skupinu smB-21^{lo} (zvýšená frekvence CD21^{lo} populace nad 10% všech B lymfocytů) a na skupinu smB-21^{nom} (frekvence CD21^{lo} populace rovna nebo menší než 10% všech B lymfocytů; Wehr *et al.*, 2007).

Populace B lymfocytů	Celkové B lymfocyty	Izotypově přepnuté B lymfocyty	CD21 ^{low} B lymfocyty	Transientní buňky
Skupina CVID pacientů	≤ 1%, B-			
	> 1%, B+	> 2%, smB+	≥ 10%, smB+21 ^{lo}	
			< 10%, smB+21 ^{norm}	
		≤ 2%, smB-	≥ 10%, smB-21 ^{lo}	
			< 10%, smB-21 ^{norm}	
				< 9%, smB-Tr ^{norm}
			≥ 9% smB-Tr ^{hi}	

Tab. 2: Rozdělení CVID pacientů podle EURO klasifikace. Upraveno podle Wehr *et al.*, 2007.

2.4.3 CD19⁺IgM⁺CD27^{CD21^{low}CD38^{low}CD24^{+/-}} populace B lymfocytů u CVID pacientů

Změny ve vlastnostech, funkcích a frekvencích B buněčných populací jsou charakteristickým rysem onemocnění CVID a využívají se jako klasifikační kritéria pacientů. Přestože již existují tři klasifikační schémata pacientů s CVID, objevují se stále nové poznatky, které mohou vést k jejich přehodnocení.

V rámci analýzy B lymfocytárních populací u CVID pacientů metodou průtokové cytometrie bylo zjištěno, že CVID pacienti mají signifikantně zvýšenou frekvenci dvou doposud nepopsaných B buněčných populací. Jedná se o populace s fenotypem CD19⁺IgM⁺CD27^{CD21^{low}CD38^{low}CD24⁺} (dále jako CD24⁺) a CD19⁺IgM⁺CD27^{CD21^{low}CD38^{low}CD24⁻} (dále jako CD24⁻; Vlková, nepublikovaná data, grant IGA MZ ČR NR/9198-3).

Tyto populace B lymfocytů nebyly doposud charakterizovány ani u zdravých jedinců ani u CVID pacientů nebo jiné primární imunodeficiencie. Není tedy známo, zda se již tyto buňky setkaly s antigenem a prošly antigenem řízenou selekcí, somatickou hypermutací, izotypovým přesmykem a afinitní maturací. Zařazení těchto populací do vývojové linie B lymfocytů je rovněž nejasné.

Cenné informace o vývoji B buněčné populace, ale i o vývoji jediné konkrétní B buňky, dokáže zprostředkovat molekulární charakteristika variabilních oblastí genů pro těžké řetězce imunoglobulinů. Tyto genové úseky prochází během vývoje B lymfocytu rekombinačními a mutačními procesy a proto zaznamenávají velké množství změn, které je pak možné detekovat molekulárně biologickými metodami.

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce, která je rovněž součástí grantu IGA MZ ČR NR/9198-3, je charakterizovat $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ B buněčné populace na molekulární úrovni pomocí analýzy variabilních oblastí genů pro těžké řetězce imunoglobulinů.

Dílčí cíle jsou následující:

1. Analýza genů pro variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů u populací B lymfocytů $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ se zaměřením na:
 - a) mutační frekvence (stimulace antigenem)
 - b) využití konkrétních V_H , D_H , J_H segmentů
 - c) délku CDR3 oblastí
 - d) nukleotidové a aminokyselinové složení CDR3 oblasti (klonální příbuznost B lymfocytů)
2. Analýza izotypového přesmyku, tj. přítomnost μ a γ transkriptů.
3. Srovnání molekulární charakteristiky těchto populací u zdravého dárce a CVID pacienta.

4 Materiál a metody

Zpracování periferní krve a příprava buněčné suspenze pro průtokovou cytometrii byla prováděna v laboratořích Kliniky dětské hematologie a onkologie FN Motol. Třídění buněk sledovaných B buněčných populací v periferní krvi průtokovým cytometrem s třídícím modulem FACS Aria (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) probíhalo rovněž v laboratořích Kliniky dětské hematologie a onkologie FN Motol.

4.1 Zpracování periferní krve

Periferní krev byla odebrána pacientům a zdravým jedincům na základě jejich podepsaného informovaného souhlasu. Periferní mononukleární buňky (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) byly separovány pomocí centrifugace v hustotním gradientu Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Švédsko). Tento postup byl použit jak pro přípravu buněčné suspenze pro průtokovou cytometrii tak pro třídění studovaných populací pomocí průtokového cytometru se sortovacím modulem.

Periferní krev byla odebrána do odběrových zkumavek s K₂EDTA a naředěna 1x PBS (pH 7,2-7,4) v poměru 1:1 (9ml krve s 9ml 1x PBS). Směs byla navrstvena na 9ml Ficollu v 50ml zkumavce (BD Biosciences, Le Pont De Claix, Francie) a stočena na centrifuze při 400x g při 10°C po dobu 30 minut. Prstenec tvořený lymfocyty, monocyty a nezralými granulocyty byl odebrán do nové 50ml zkumavky (BD Biosciences) a doplněn do 5ml 1% albuminem (Calbiochem, San Diego, CA, USA) v 1x PBS. Vzorek byl stočen na centrifuze při 190x g při 10°C po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit, sediment resuspendován ve 4ml 1% albuminu (Calbiochem) v 1x PBS a opět stočen na centrifuze při 190x g při 10°C po dobu 10 min. Supernatant byl opět odebrán tak, aby zbyl sediment o objemu asi 100μl, který byl dále barven pro průtokovou cytometrii nebo třídění buněk.

4.2 Značení buněčné suspenze pro průtokovou cytometrii a třídění buněk

Značení buněčné suspenze pro průtokovou cytometrii a třídění buněk bylo prováděno v laboratořích Kliniky dětské hematologie a onkologie FN Motol podle příložených protokolů. Suspenze PBMC o objemu 100μl byla 15 minut inkubována ve tmě při 4°C s vybranými myšími monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorochromy proti povrchovým antigenům lidských B lymfocytů. Jednalo se

o protilátky anti-CD27 Pacific Blue, klon LT27 (Exbio Praha a.s., Česká Republika), anti-CD38 Alexa Fluor 700, klon HIT2 (Exbio), anti-human IgM FITC, klon G20-127 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), anti-CD21 APC, klon, B-ly4 (BD Pharmingen), anti-CD24 PE, klon ALP9 (Immunotech, Marseille, Francie), anti-CD19 PC7, klon J3-119 (Immunotech).

Použité monoklonální protilátky byly vždy aplikovány v jednom vzorku dohromady. Objem jednotlivých protilátek je uveden v tabulce 3.

Protilátky	Objem protilátek (μl)
IgM/FITC, CD21/APC, CD24/PE, CD19/PC7, CD27/Pacific Blue, CD38/Alexa Fluor 700	20/20/20/10/4/2

Tab. 3: Objem monoklonálních protilátek použitých pro značení vybraných populací B lymfocytů.

Součástí protokolů byly také tzv. kompenzační kontroly a kontroly pro jednotlivé monoklonální protilátky sloužící především pro nastavení průtokového cytometru před vlastním měřením nebo tříděním.

Po inkubaci byla buněčná suspenze vždy dvakrát promyta v 1x PBS (pH 7,2 – 7,4) a stočena na centrifuze při 190 x g při 10°C po dobu 10 minut. Poté byla suspenze převedena do 100μl WSB roztoku (wash and staining buffer).

Měření frekvencí B buněčných populací v periferní krvi probíhalo na průtokovém cytometru s třídícím modulem FACS Aria (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) v laboratoři Kliniky dětské hematologie a onkologie FN Motol.

Způsob vymezení studovaných B buněčných populací je znázorněn na obrázku 9.

4.3 RT-PCR na úrovni jedné buňky (single cell RT-PCR)

B lymfocyty obou populací byly tříděny pomocí průtokového cytometru s třídícím modulem (FACS Aria) do 96-ti jamkových destiček (BD Biosciences, Le Pont De Claix, Francie) tak, že na každou jamku připadla právě jedna buňka (obr. 10). Každá jamka obsahovala 50μl lyzačního RT-PCR pufru (tab. 4).

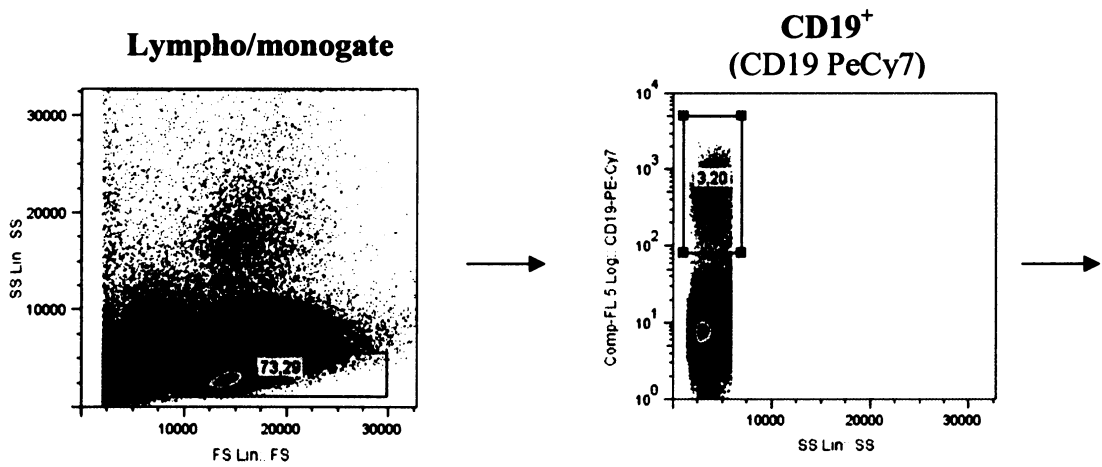
	objem (μ l / jamka)	konečná koncentrace
H ₂ O	29,5	-
0,1 M DTT	2,5	5mM
RNasin (40U/ μ l)	0,5	20U
50nM Spermidin	0,5	0,5nM
10 μ g μ l BSA	0,05	0,5 μ g
800ng/ μ l Oligo dT	0,45	400ng
10% Triton X	5,0	1%
5x RT PCR buffer	10,0	1x
10mM dNTPs	1,0	0,2mM
Reverzní transkriptáza	0,5	

Tab. 4 : Složení lyzačního pufru pro RT-PCR.

Ihned po vytrídění buněk byla zahájena syntéza prvního vlákna cDNA podle mRNA templátu v cykleru (Bio-Rad, Hercules, USA) za podmínek:

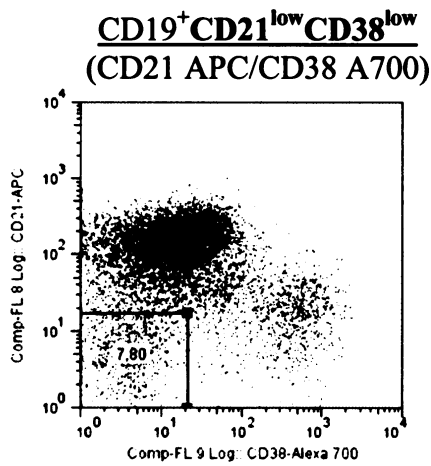
50°C 60 min

4°C trvale

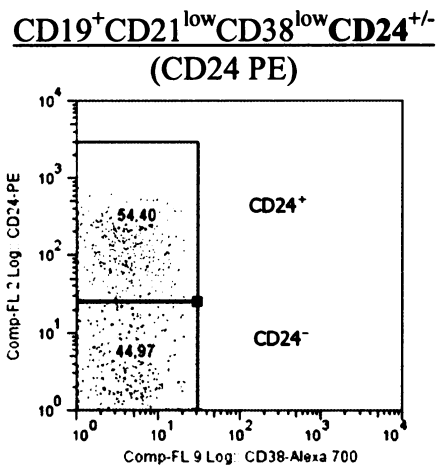


Výběr lymfocytů a monocytů (73,29% všech buněk) podle jejich velikost a granularity na základě měření forward scatteru (FSC) a side scatteru (SSC).

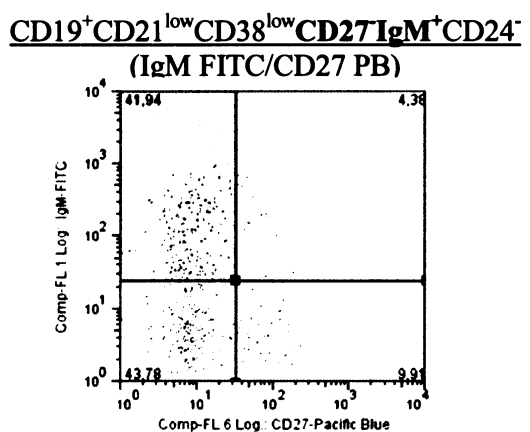
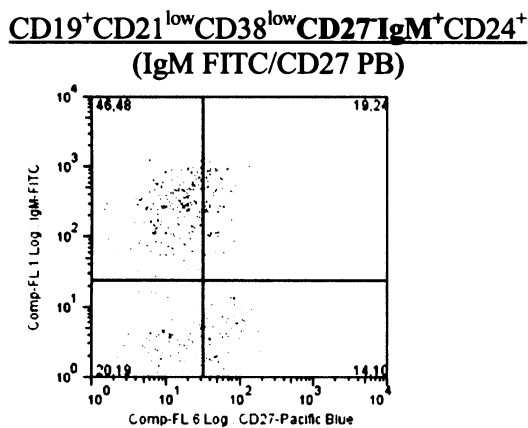
Výběr všech CD19 pozitivních buněk (B lymfocytů), které tvoří 3,2 % buněk z předchozího výběru.



Výběr CD21^{low}CD38^{low} buněk (7,8 %) z CD19⁺ pozitivních buněk z předchozího výběru.



Výběr CD24⁺ a (54,4%) a CD24⁻ (44,97%) B lymfocytů z CD19⁺CD21^{low}CD38^{low} buněk.



Výběr obou populací (CD24⁺ i CD24⁻) podle exprese CD27 a IgM, tedy výběr CD27⁺ a IgM⁺ B lymfocytů.

Obr. 9: Příklad výběru B lymfocytů pro třídění průtokovým cytometrem.

4.4 Amplifikace variabilních oblastí genů pro těžké řetězce imunoglobulinů

Přeskupené $V_H D_H J_H$ segmenty byly amplifikovány pomocí publikované nested PCR (Ruzickova *et al.*, 2002).

4.4.1 Amplifikace externími primery

Pro externí PCR byla použita směs primerů (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) pro tzv. signální (leader) sekvenční variabilních genových segmentů (SVH1-SVH6) spolu s jedním z primerů pro konstantní oblast imunoglobulinových genů (Mju, Ga; Küppers *et al.*, 1993).

SVH1 5'- CCA TGG ACT GGA CCT GGA - 3'
SVH2 5'- ATG GAC ACA CTT TGC TMC AC - 3'
SVH3 5'- CCA TGG AGT TTG GGC TGA GC - 3'
SVH4 5'- ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT - 3'
SVH5 5'- ATG GGG TCA ACC GCC ATC CT - 3'
SVH6 5'- ATG TCT GTC TCC TTC CTC AT - 3'
Mju 5'- TCA GGA CTG ATG GGA AGC CC - 3'
Ga 5'- CAG GCC GCT GGT CAG AGC G - 3'

Pro externí PCR (80 μ l) byla připravena reakční směs (tab. 5), která byla rozpipetována po 75 μ do jamek 96-ti jamkové destičky (BD Biosciences).

	objem (μ l/jamka)	konečná koncentrace
H ₂ O	52,98	-
25mM MgCl ₂	8	2,5mM
100 μ M SVH1	0,56	0,7 μ M
100 μ M SVH2	0,56	0,7 μ M
100 μ M SVH3	0,56	0,7 μ M
100 μ M SVH4	0,56	0,7 μ M
100 μ M SVH5	0,56	0,7 μ M
100 μ M SVH6	0,56	0,7 μ M
100 μ M Mju/(Ga)	0,56	0,7 μ M
10mM dNTPs	1,6	0,2mM
10x PCR pufr	8	1x
Taq polymeráza (5U/ μ l)	0,5	2,5 U/jamka

Tab. 5 : Reakční směs pro externí PCR.

Do každé jamky bylo přidáno 5 μ l cDNA a kapka minerálního oleje (Top-Bio, Praha, Česká republika). Amplifikační reakce probíhala v cykleru (Bio-Rad) v těchto krocích:

1 cyklus:	95°C	7:00 min
	50°C	1:00 min
	72°C	1:30 min
35 cyklů:	94°C	1:00 min
	50°C	0:30 min
	72°C	1:30 min
1 cyklus:	4°C	trvale

4.4.2 Amplifikace interními primery

Z každé externí PCR reakce bylo provedeno dalších 6 interních PCR amplifikací s použitím vždy jednoho primeru (Invitrogen Corporation) specifického pro FR1 oblast konkrétního V_H segmentu jedné V_H rodiny (tj. pro každou rodinu zvlášť) v kombinaci s primery pro všechny možné J_H segmenty (Küppers *et. al*, 1993).

iVH1 FRI	5'- CCT CAG TGA AGG TYT CCT GCA AGG C - 3'
iVH2 FRI	5'- GTC CTG CGC TGG TGA AAC CCA CAS A - 3'
iVH3 FRI	5'- GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG - 3'
iVH4 FRI	5'- GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C - 3'
iVH5 FRI	5'- AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A - 3'
iVH6 FRI	5'- CTC ACT CAC CTG TGC CAT CTC CGG - 3'
iJH 1/3/4/5	5'- CGA CGG TGA CCA GGG TBC CYT GGC C - 3'
iJH 2,5	5'- CGA CAG TGA CCA GGG TGC AC GGC C - 3'
iJH6	5'- CGA CGG TGA CCG TGG TCC CTT GCC - 3'

Pro interní PCR (80 μ l) byla připravena reakční směs (tab. 6), která byla rozpipetována po 75 μ do jamek 96-ti jamkové destičky (BD Biosciences).

	objem (μl /jamka)	konečná koncentrace
H ₂ O	54,98	-
25mM MgCl ₂	8	2,5mM
10mM dNTPs	1,6	0,2mM
100 μM iVH primeru	0,48	0,6 μM
100 μM iJH 6 primeru	0,48	0,6 μM
100 μM iJH2/5 primeru	0,48	0,6 μM
100 μM iJH1/3/4/5 primeru	0,48	0,6 μM
10x PCR pufr	8	1x
Taq polymeráza (5U/ μl)	0,5	2,5 U/jamka

Tab 6. : Reakční směs pro interní PCR.

Do každé jamky bylo přidáno 5 μl cDNA a kapka minerálního oleje (Top-Bio).

Amplifikační reakce probíhala v cykleru (Bio-Rad) v těchto krocích:

1 cyklus	95°C	7:00 min
	63°C	1:00 min
	72°C	1:30 min
35 cyklů:	94°C	1:00 min
	63°C	0:30 min
	72°C	1:30 min
1 cyklus:	4°C	trvale

4.5 Sledování přítomnosti specifického PCR produktu

Přítomnost PCR produktu jsme zjišťovali pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu. Naváženou agarózu jsme rozpustili v odpovídajícím množství 1xTBE a nechali projít varem. Přidali jsme ethidium bromid (konečná koncentrace 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gelu, Sigma, St. Louis, USA) a nechali chladnout při pokojové teplotě. Zchladlou směs jsme nalili do připraveného nosiče gelu. Po ztuhnutí jsme gel přenesli do elektroforetické vany (Bio-Rad) a dolili 1x TBE tak, aby byl ponořen.

Do jamek jsme nanášeli vždy po 20 μl PCR produktu s 5 μl SLB (Sigma Loading Bufer, Sigma) a do jedné jamky jsme aplikovali 4 μl velikostního standardu DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Německo) s 1 μl SLB (Sigma). Dělení probíhalo při napětí 80V po dobu 75 minut. Přítomnost PCR produktů byla zjištěna pomocí transluminátoru (Ultra-Lum, Claremont, Canada) a vyfotografována kamerou (Uvitec, Cambridge, UK).

4.6 Purifikace PCR produktů

Purifikace PCR produktů z agarózového gelu byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction Kitu (QIAGEN, Hilden, Německo).

Nejprve jsme nechali zbylá množství pozitivních vzorků z předchozího kroku (60 μ l) rozdělit pomocí gelové agarózové elektroforézy v 1,5% gelu v 1x TBE při napětí 80V po dobu asi 70 minut. Gel byl opět obarven ethidium bromidem (Sigma) o konečné koncentraci 0,01 μ g/ml gelu. Při pipetování jsme vynechali vždy jednu jamku, abychom zamezili vzájemné kontaminaci PCR produktů.

Každý proužek o velikosti cca 250bp jsme z gelu vyřízli pomocí skalpelu a vložili do předem označené sterilní 1,5ml zkumavky. Přidali jsme 600 μ l QG pufru a inkubovali zkumavky asi 10 minut při 50°C ve vodní lázni tak, aby se gel zcela rozpustil. Zkumavky jsme vyndali z vodní lázně, do každé přidali 200 μ l isopropanolu (Penta, Chrudim, ČR) a obsah dlouze promíchali na vortexu (Janke& Kunkel, Staufen, Německo). Část obsahu zkumavky (asi polovinu) jsme přelili na speciální kolonku s filtrem (spin column) ve zkumavce a stočili na mikrocentrifuze (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 1 minutu při 11.000x g. Vyndali jsme kolonku ze zkumavky, vylili její obsah a nalili jsme zbytek (druhou polovinu) zkumavky na kolonku. Opět jsme zkumavky centrifugovali 1 minutu při 11.000x g. Vyndali jsme kolonku a obsah zkumavky vylili. Na kolonku jsme nanесли 500 μ l QG pufru a zkumavky jsme centrifugovali 1 minutu při 11.000x g. Obsah zkumavky jsme vylili. Přidali jsme 750 μ l PE-WASH pufru s etanolem (Penta, Chrudim, ČR) a inkubovali jsme zkumavky 5 minut při pokojové teplotě (room temperature, RT). Zkumavky jsme centrifugovali 1 minutu při 11.000x g a obsah zkumavky jsme vylili. Kolonky jsme vrátili zpět do zkumavky a centrifugovali ještě jednou 1 minutu při 11.000x g. Kolonky jsme přenesli do speciálních zkumavek se šroubovacími víčky. Na kolonku jsme nanесли 30 μ l EB pufr, zkumavky jsme inkubovali 1 minutu při RT a poté centrifugovali 1 minutu při 18.000x g. Filtry jsme vyhodili, zkumavky zavřeli, popsali a takto přečištěný produkt jsme dále používali k sekvenování.

4.7 Sekvenování PCR produktů

Pro sekvenační PCR reakce (10 μ l) jsme používali Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit verze 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Pro každý sekvenovaný vzorek jsme si připravili reakční směs (tab 7.), kterou jsme rozpipetovali do jamek destičky (BD Biosciences) nebo stripů (Eppendorf, Hamburg, Německo).

	Objem (μl /jamka)
H ₂ O	2 μl
Big Dye pufr	2 μl
5' primer (ředěný v poměru 1 : 20)	1 μl

Tab. 7: Reakční směs pro sekvenační PCR.

K reakční směsi jsme přidali 5 μl purifikovaného PCR produktu.

Sekvenační reakce probíhala v cykleru (Bio-Rad) za těchto podmínek:

34 cyklů:	96°C	0:10 min
	45°C	0:05 min
	60°C	4:00 min
1 cyklus	4°C	trvale

4.8 Precipitace sekvenačního produktu etanolem

Pro každý sekvenační produkt jsme si připravili precipitační směs (tab. 8) o celkovém objemu 350 μl .

	Objem (μl /vzorek)
H ₂ O	90 μl
3 M NaAc (pH 5,2)	10 μl
100 % etanol	250 μl

Tab. 8: Precipitační směs.

K precipitační směsi v 1,5ml zkumavkách jsme přidali 10 μl sekvenačního produktu, který jsme předtím krátce centrifugovali. Vzorek jsme řádně zvortexovali a poté centrifugovali po dobu 18 minut při 18.000x g. Supernatant jsme opatrně slili a k sedimentu jsme přidali 350 μl 70% etanolu (Penta). Vzorek jsme stočili na centrifuze při 18.000x g. po dobu 8 minut. Etanol jsme odsáli pipetou a sediment nechali v laminárním boxu (Flow Laboratories) vysušit. Po dokonalém odpaření veškerého etanolu jsme zkumavky zavřeli a vzorky centrifugovali při 18.000x g po dobu 10 minut.

4.9 Sekvenování

Vlastní sekvenování probíhalo ve Středisku sekvenování DNA při Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i.

(www.biomed.cas.cz/mbu/lab119/index.htm) na sekvenátoru ABI PRISM 3130xl (AME Bioscience, Toroe, Norway).

4.10 Vyhodnocování a analýza přeskupených $V_H D_H J_H$ genů pro těžké řetězce imunoglobulinů

Získané sekvence přeskupených $V_H D_H J_H$ genů jsme porovnali se zárodečnými, nemutovanými sekvencemi, které jsou volně dostupné v databázi V-BASE (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk). Takto jsme zjistili, kolik mutací obsahují naše sekvence a vypočetli jsme mutační frekvenci (mf) přeskupených $V_H D_H J_H$ genů podle vzorečku:

$$mf(\%) = \frac{n}{N} \times 100$$

(n=počet substituovaných nukleotidů ve V_H oblasti daného transkriptu, N=celková délka detekované V_H oblasti daného transkriptu)

Odesláním našich sekvencí do V-BASE jsme také zjistili, které konkrétní V_H , D_H a J_H genové segmenty byly použity při přeskupování imunoglobulinových genů v příslušných B buňkách a tedy také jaká je sekvence CDR1 - CDR3 oblastí a FR2 a FR3 oblastí.

Porovnáním mutací ve V_H segmentech získaných mRNA transkriptů se zárodečnými sekvencemi V_H genů a následným přepisem mutovaných kodonů do aminokyselin jsme rozlišili mutace záměnné (replacement, R) a tiché (silent, S).

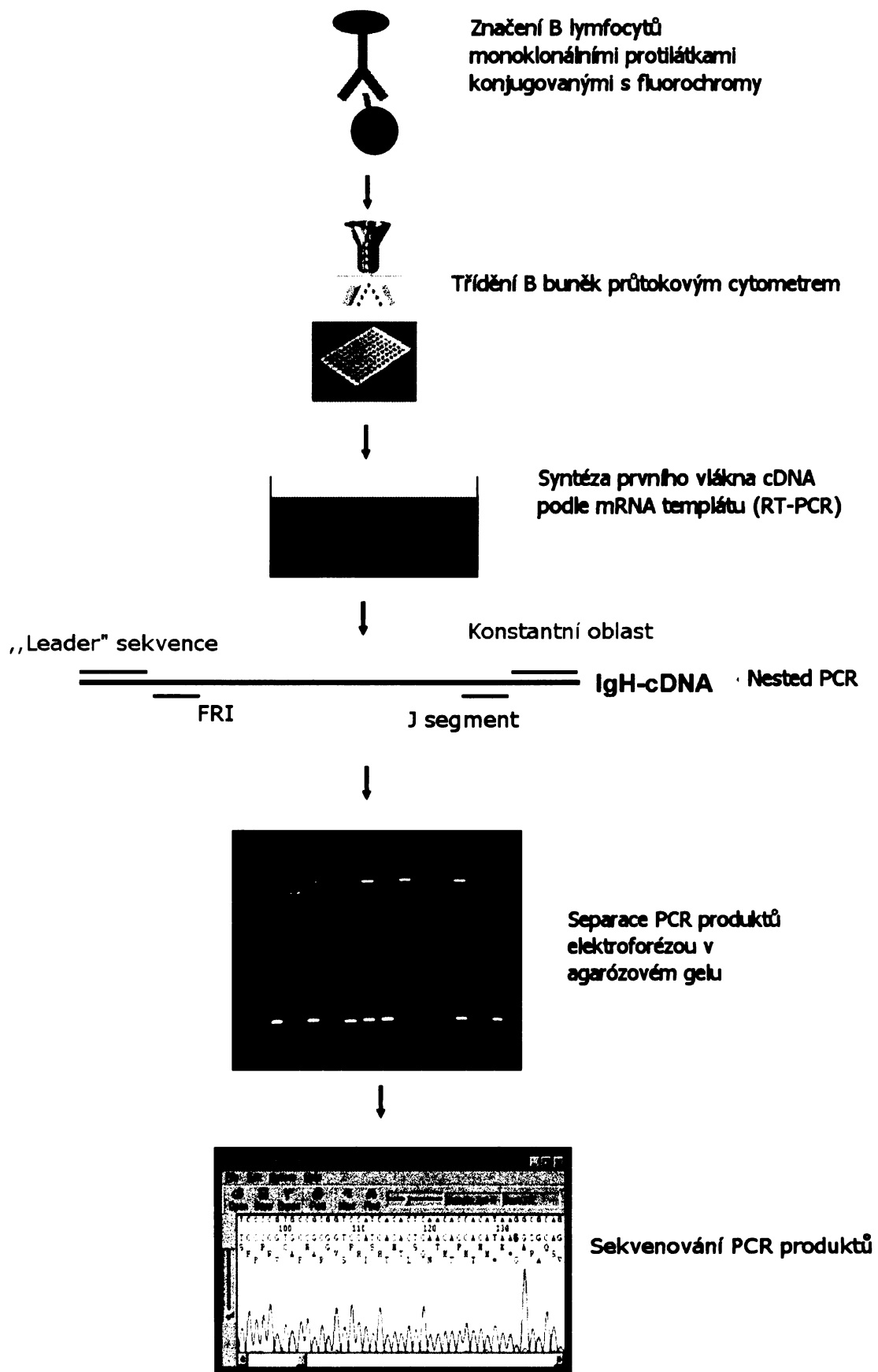
Přepis nukleotidové sekvence CDR3 oblastí do sekvencí aminokyselin byl proveden pomocí statistického softwaru BioEdit verze 7.0.0 (Tom Hall, Carlsbad, CA, USA, volně dostupné z adresy <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>).

4.11 Statistická analýza

Pro statistické zhodnocení dat jsme použili neparametrický Mann-Whitneův t-test, Fisherův exaktní test, a test dobré shody (χ^2 test), které byly provedeny pomocí softwaru GraphPad Prism verze 3 (GraphPad, San Diego, USA).

Grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Celý výše uvedený metodický postup od třídění jednotlivých B lymfocytů po získání sekvenačního histogramu je schematicky znázorněn na obr. 10.



Obr. 10: Schéma metodického postupu.

4.12 Seznam použitých chemikálií a přístrojů

4.12.1 Chemikálie a kity

Acetát sodný (NaAC, 3M, pH 5,2)	Sigma, St. Louis, USA
Albumin	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Agaróza	Top-Bio, Praha, ČR
Azid sodný	Sigma, St. Louis, USA
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, verze 1.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
BSA	Serva, Heidelberg, Německo
DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
dNTPs 10 mM	Sigma, St. Louis, USA
DTT 0,1 M	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
EB pufr	QIAGEN GmbH, Hilden, Německo
Ethidium bromid	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll-Paque	Pharmacia, Uppsala, Švédsko
Izopropylalkohol	Penta, Chrudim, ČR
Etanol	Penta, Chrudim, ČR
MgCl ₂ 25 mM	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
Minerální PCR olej	Top-Bio, Praha, Česká republika
NaAc 3M	Sigma, St. Louis, USA
PCR pufr 10x	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
PCR H ₂ O	Top-Bio, Praha, Česká republika
PE – WASH pufr	QIAGEN GmbH, Hilden, Německo
Primery na nested PCR 100 μM	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
QG pufr	QIAGEN GmbH, Hilden, Německo
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Německo

Oligo dT primer	Promega Corporation, Madison, USA
RNasin plus RNase inhibitor	Promega Corporation, Madison, USA
SLB	Sigma, St. Louis, USA
Spermidin 50 nM	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
PCR H ₂ O	Top-Bio, Praha, Česká Republika
Taq polymeráza	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
PCR H ₂ O	Top-Bio, Praha, Česká Republika
PrimeScript pufr 5x	TaKaRa, Shiga, Japonsko
Reverzní transkriptáza	TaKaRa, Shiga, Japonsko
Tris base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Serva, Heidelberg, Německo
Triton X-100	Serva, Heidelberg, Německo
Želatína	Sigma, St. Louis, USA

4.12.2 Protilátky

Monoclonal Mouse Anti-Human IgM/FITC, klon G20-127	} BD Pharmingen, San Jose, CA USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD21/APC, klon, B-ly4	
Monoclonal Mouse Anti-Human CD24/PE, klon ALP9	} Immunotech, Marseille, France
Monoclonal Mouse Anti-Human CD19/PC7, klon J3-119	
Monoclonal Mouse Anti-Human CD27/Pacific Blue, klon LT27	} Exbio Praha a. s., Vestec, Česká Republika
Monoclonal Mouse Anti-Human CD38/Alexa Fluor 700, klon HIT2	

4.12.3 Roztoky

1,5% agarózový gel s ethidium bromidem:

chemikálie	množství	konečná koncentrace
agaróza	6g	1,5%
1x TBE	400ml	-
ethidium bromid (1µg/ml)	0,04ml	0,01µg/ml

5x TBE:

chemikálie	množství	konečná koncentrace
Tris base	54g	450mM
kyselina boritá	27,5g	450mM
0,5M EDTA (pH 8)	20ml	10mM
H ₂ O	doplnit do 1000 ml	-

1x TBE:

200ml 5x TBE + 800 ml H₂O

10x PBS:

chemikálie	množství	konečná koncentrace
NaCl	80g	1,37M
KCl	2g	0,027M
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	29g	0,081M
KH ₂ PO ₄	2g	0,015M
H ₂ O	doplnit do 1000 ml	-

1x PBS:

10 ml 10x PBS + 90 ml H₂O

WSB:

chemikálie	množství	konečná koncentrace
želatina	4ml	0,18%
azid sodný	1g	0,1%
1x PBS	doplnit do 1000 ml	-

4.12.4 Přístroje a vybavení

Automatické pipety	Labnet, NJ, USA
	Gilson, Middleton, WI, USA
Automatický dávkovač	Eppendorf, Hamburg, Německo
Minicentrifuga Microfuge 18	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Stolní centrifuga Alegra X-22R	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Destičky 96-ti jamkové	BD Biosciences, Le Pont De Claix, Francie
Elektroforetické vany	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Elektronické váhy	Sartorius AG, Gottingem, Německo
CD kamera s termotiskárnou	Uvitec, Cambridge, UK
Laminární box	Flow Laboratories Ltd, Surrey UK
Mikrocentrifuga	Hermle Labortechnik, GmbH, Wehingen, Německo
Mikrovlnná trouba MOM 717	Goddess, Zlín, Česká Republika
Mikrozkumavky	Eppendorf, Hamburg, Německo
Multikanálová pipeta	Finnpipette, Vantan, Finsko
PCR cykler	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Průtokový cytometr s třídícím modulem FACS Aria	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Rukavice latexové	Semperit, Vídeň, Rakousko
Sekvenátor ABI PRISM 3130xl	AME Bioscience, Toroe, Norsko
PCR stripy s víčky	Eppendorf, Hamburg, Německo
Špičky k automatickým pipetám	Eppendorf, Hamburg, Německo
UV Transilluminátor	Ultra-Lum, Claremont, Canada
Vodní termostat	Dittmann, Bytom, Polsko
Vortex	Janke& Kunkel, Staufen, Německo
Zdroj elektrického napětí	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Zkumavky 50 ml	BD Biosciences, Le Pont De Claix, Francie

5 Výsledky

5.1 Klinické parametry analyzované skupiny CVID pacientů

Do studie bylo zařazeno celkem 48 pacientů s diagnózou CVID. Jednalo se o 25 žen (52%) a 23 mužů (48%), kteří byli pacienti FN Motol (14 pacientů, 30%) a FN u Svaté Anny v Brně (34 pacientů, 70%). Klinické parametry pacientů, které poskytla Mgr. Marcela Vlková, PhD. z Ústavu klinické imunologie a alergie FN u Sv. Anny v Brně, jsou shrnuty tabulkách 9 a 10.

Pohlaví	25 žen (52%), 23 mužů (48%)
Rok narození	1963 (\pm 14 let)
Věk v době objevení příznaků CVID	29 let (\pm 14)
Věk v době diagnózy CVID	36 let (\pm 14)
Prodleva mezi objevením příznaků a diagnózou CVID	3 roky (\pm 6 let)
Věk v době analýzy	44 let (\pm 16)

Tab. 9: Klinické parametry sledované skupiny CVID pacientů; medián (\pm standardní chyba)

Charakteristika	Počet pacientů (%)
Pneumonie během prodlevy v diagnóze	24 (50)
Pneumonie po zahájení léčby IVIG/SCIG	7 (15)
Granulomy	2 (4)
Záněty průdušek	20 (42)
Fibróza	13 (27)
Emfyzém (rozedma plic)	9 (19)
Obstrukční plicní nemoc	23 (48)
Restriktivní plicní poruchy	8 (17)
Respirační insuficience	7 (15)
Splenomegalie	23 (48)
Lymfadenopatie	10 (21)
Autoimunitní projevy	14 (29)

Tab. 10: Klinické symptomy sledované skupiny CVID pacientů

Podmínkou pro měření B buněčných populací průtokovým cytometrem je frekvence B lymfocytů v periferní krvi vyšší než 1%. Všichni sledovaní CVID pacienti splňovali tuto podmínku.

Podle frekvence izotypově přepnutých paměťových buněk a CD21^{low} B buněk lze CVID pacienty rozdělit do 3 skupin tzv. Freiburské klasifikace (Wehr *et al.*, 2007, viz kapitola 2.4.2.3.1). Ze skupiny námi sledovaných CVID pacientů jich 15 (31%) spadá do skupiny Ia, 16 (33%) do skupiny Ib, a 17 (36%) do skupiny II (tab. 11).

Skupina podle Freiburgské klasifikace	Ia	Ib	II
Počet pacientů (%)	15 (31)	16 (33)	17 (36)

Tab. 11: zařazení CVID pacientů do skupin Freiburgské klasifikace (podle Wehr *et al.*, 2007).

5.2 Analýza frekvencí B buněčných populací $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ průtokovým cytometrem

Frekvence sledovaných B buněčných populací $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ (dále označována jako $CD24^+$) a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ (dále jako $CD24^-$) byly změřeny pomocí průtokového cytometru u sledované skupiny CVID pacientů a také u 56-ti zdravých dárců. Způsob vymezení sledovaných populací je znázorněn na obrázku 9. Celkem 10 CVID pacientů bylo měřeno dvakrát, v rozmezí minimálně 6-ti měsíců, a naměřené hodnoty byly použity pro statistické zpracování samostatně. Měření provedl MUDr. Tomáš Kalina, PhD. z Kliniky dětské hematologie a onkologie FN Motol.

Hodnoty frekvencí, které jsou dále použity pro statistickou analýzu, vyjadřují, kolik procent tvoří daná populace z konkrétního výběru (viz kapitola 4, obr. 9, 5. panel pro populaci $CD24^+$ a 6. panel pro populaci $CD24^-$).

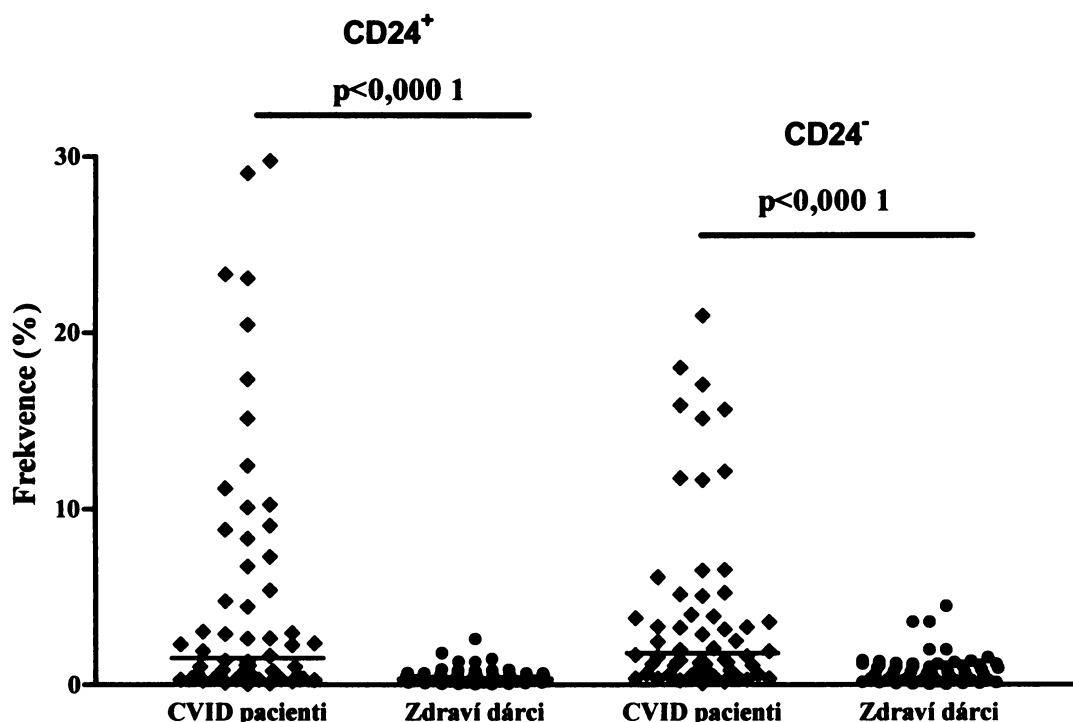
Pomocí neparametrického Mann-Whitneyova t-testu byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p < 0,0001$) ve frekvencích populací $CD24^+$ i $CD24^-$ v periferní krvi mezi CVID pacienty a zdravými dárci (obr. 11). Frekvence populace $CD24^+$ se u CVID pacientů pohybuje v rozmezí 0,02 – 29,75% s mediánem 1,52% a standardní chybou 7,48%. U zdravých dárců se frekvence této populace pohybuje v rozmezí 0,02 – 2,61%, s mediánem 0,30% a standardní chybou 0,47% (tab. 12).

Frekvence populace $CD24^-$ se u CVID pacientů pohybuje v rozmezí 0,6 - 20,97% s mediánem 1,81% a standardní chybou 5,25%. U zdravých dárců se frekvence populace $CD24^-$ pohybuje v rozmezí 0,02 – 4,48% s mediánem 0,70% a standardní chybou 0,88% (tab. 12).

V obou případech byly sledované B lymfocytární populace výrazně expandované v souboru vyšetřovaných CVID pacientů (obr. 11).

%	CD24 ⁺		CD24 ⁻	
	CVID pacienti	Zdraví dárce	CVID pacienti	Zdraví dárce
Minimum	0,02	0,02	0,06	0,02
Maximum	29,75	2,61	20,97	4,48
Medián	1,52	0,30	1,81	0,70
Standardní chyba	7,48	0,47	5,25	0,88

Tab. 12: Statistické hodnoty sledovaných populací B lymfocytů u skupiny CVID pacientů a zdravých dárců (v %).



Obr. 11: Srovnání frekvencí $CD19^+IgM^+CD27^+CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^+CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ populací B lymfocytů u CVID pacientů a zdravých dárců, vodorovné čáry vyznačují mediány.

5.3 Analýza genů pro variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů jednotlivých buněk z populací $CD19^+IgM^+CD27^+CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^+CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ B lymfocytů

Pomocí průtokového cytometru s třídícím modulem FACS Aria (Becton, Dickinson and Company) bylo získáno celkem 96 B lymfocytů CVID pacienta a 96 B lymfocytů zdravého dárce. Vždy polovina buněk (48) představovala populaci $CD19^+IgM^+CD27^+CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a druhá polovina populaci $CD19^+IgM^+CD27^+CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$.

5.3.1 Klinické parametry CVID pacienta

Pacientovi bylo onemocnění CVID diagnostikováno v roce 2008. Jeho věk v době analýzy, tedy při měření frekvence a třídění vybraných populací jeho B lymfocytů, byl 32 let. Hlavními projevy nemoci jsou u tohoto pacienta časté průjmy. Pacient zároveň trpí Crohnovou chorobou. Další projevy CVID onemocnění jako granulomy, fibróza, emfyzém, obstrukční plicní nemoc, restriktivní plicní poruchy, respirační insuficience a lymfadenopatie nebyly u pacienta zaznamenány. Pacient je léčen intravenózní substitucí imunoglobulinů. Klinické parametry tohoto pacienta, které poskytla Mgr. Marcela Vlková, PhD. z Ústavu klinické imunologie a alergie FN u Sv. Anny v Brně, shrnuje tab. 13, hodnoty koncentrací imunoglobulinů pak tab. 14.

Pohlaví	muž
Rok narození	1977
Věk v době objevení příznaků CVID	30 let
Věk v době diagnózy CVID	31 let
Prodleva mezi objevením příznaků a diagnózou CVID	1 rok
Věk v době analýzy	32 let

Tab. 13: Klinické parametry CVID pacienta.

	IgG	IgA	IgM
Koncentrace Ig v krvi pacienta v době diagnózy CVID (g/l)	0,92	0,05	0,141
Referenční hodnoty koncentrace Ig v krvi pro danou věkovou skupinu (g/l)	7,0 - 16,0	0,70 - 4,00	0,34-2,10

Tab. 14: Hodnoty koncentrací Ig v krvi CVID pacienta v době diagnózy CVID a referenční hodnoty koncentrací Ig pro danou věkovou skupinu (g/l).

5.3.2 Distribuce transkriptů mRNA pro IgM a IgG izotypy imunoglobulinů v jednotlivých populacích

Z vyříděných B lymfocytů populace CD24⁺ CVID pacienta bylo získáno celkem 29 produktivních V_HD_HJ_H přestaveb, z toho 28 (96,6%) transkriptů izotypu IgM a 1 (3,4%) transkript izotypu IgG. V populaci CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta jsme detekovali přítomnost celkem 23 transkriptů, z nichž 20 (87,0%) bylo izotypu IgM a 3 (13,0%) izotypu IgG.

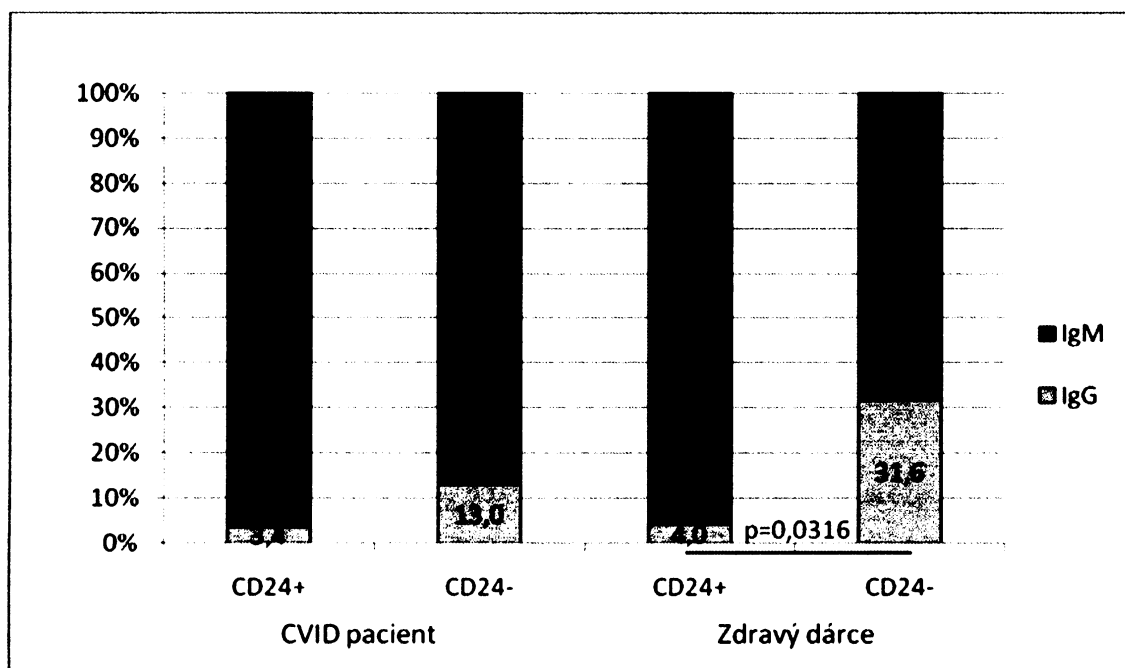
V populaci CD24⁺ zdravého dárce jsme z vyříděných B lymfocytů získali celkem 25 produktivních V_HD_HJ_H přestaveb, z toho 24 (96,0%) transkriptů izotypu IgM

a 1 (4,0%) transkript izotypu IgG. V populaci CD24⁻ B lymfocytů zdravého dárce jsme zjistili přítomnost 19 transkriptů, z nichž bylo 13 (68,4%) izotypů IgM a 6 (31,6%) izotypu IgG (tab. 15, obr.12).

Pomocí Fisherova exkatního testu jsme zjistili signifikantně větší poměrné zastoupení IgG transkriptů v populaci CD24⁻ zdravého dárce oproti populaci CD24⁺ zdravého dárce (p=0,0316).

	CVID pacient		Zdravý dárce	
	CD24 ⁺	CD24 ⁻	CD24 ⁺	CD24 ⁻
Celkový počet analyzovaných V _H D _H J _H přestaveb (IgM a IgG)	29	23	25	19
Počet přestaveb izotypu IgM (%)	28 (96,6)	20 (87,0)	24 (96,0)	13 (68,4)
Počet přestaveb izotypu IgG (%)	1 (3,4)	3 (13,0)	1 (4,0)	6 (31,6)

Tab. 15: Počty V_HD_HJ_H přestaveb izotypu IgM a IgG.



Obr. 12: Poměrné zastoupení transkriptů izotypu IgM a IgG.

5.3.3 Analýza V_HD_HJ_H přeskupení v transkriptech pro izotyp IgM

Způsobem popsaným v kapitole 4.10 jsme zhodnotili zastoupení V_H, D_H a J_H genových rodin, mutační frekvence a délky CDR3 oblastí sledovaných populací B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce.

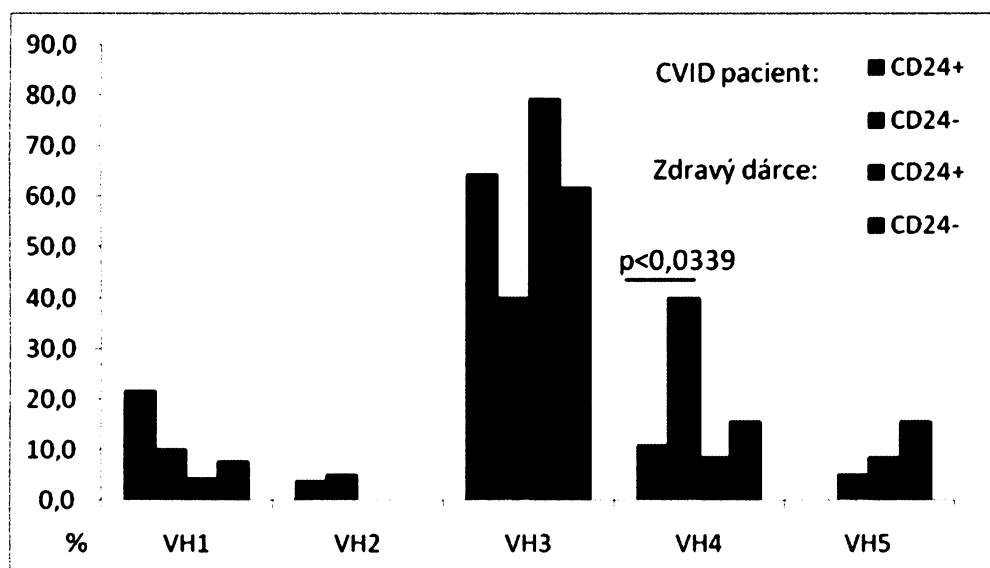
5.3.3.1 Zastoupení V_H genových rodin

V B lymfocytech obou sledovaných populací CVID pacienta i zdravého dárce byly ve V_HD_HJ_H přestavbách detekovány V_H segmenty v podobném poměru.

V transkriptech získaných z buněk populace $CD24^+$ B lymfocytů CVID pacienta byly nalezeny V_H segmenty rodin V_{H1} - V_{H4} , v populaci $CD24^-$ B buněk pak byly zaznamenány V_H segmenty rodin V_{H1} - V_{H5} . U zdravého dárce jsme v B lymfocytech obou populací objevili V_H segmenty rodin V_{H1} , V_{H3} - V_{H5} . V žádné sledované populaci B buněk CVID pacienta ani zdravého dárce jsme nedetkovali přítomnost transkriptů V_H segmentů rodiny V_{H6} rodiny. U zdravého dárce nebyly v žádné z populací zaznamenány IgM transkripty obsahující segmenty rodiny V_{H2} (obr. 13, tab. 16).

Nejčastěji byly v B lymfocytech populace $CD24^+$ CVID pacienta zaznamenány genové segmenty rodiny V_{H3} (18 z 28 transkriptů; 64,3%) a V_{H1} (6 z 28 transkriptů; 21,4%). V populaci $CD24^-$ B lymfocytů pak byly v transkriptech nejčastěji nalezeny genové segmenty rodin V_{H3} a V_{H4} (shodně 8 z 20 transkriptů; 40,%). Pomocí Fisherova exaktního testu jsme zjistili statisticky významně vyšší ($p=0,0339$) zastoupení segmentů rodiny V_{H4} v buňkách populace $CD24^+$ oproti B lymfocytům populace $CD24^-$ (40,0% vs. 10,7%).

V buňkách sledovaných populací zdravého dárce byly rovněž nejčastěji přítomny genové segmenty z rodiny V_{H3} . V populaci $CD24^+$ B lymfocytů to bylo 19 z 24 transkriptů (79,2%) a v populaci $CD24^-$ B lymfocytů pak 8 ze 13 transkriptů (61,5%). Podstatně méně častěji pak byly v buňkách těchto populací detekovány segmenty genových rodin V_{H4} , V_{H5} a V_{H1} .



Obr. 13: Zastoupení jednotlivých V_H genových rodin v populacích $CD24^+$ a $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce.

V_H rodina	CVID pacient		Zdravý dárce	
	CD24⁺	CD24⁻	CD24⁺	CD24⁻
V_H1(%)	6 (21,4)	2 (10,0)	1 (4,2)	1 (7,7)
V_H2 (%)	1 (3,6)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V_H3 (%)	18 (64,3)	8 (40,0)	19 (79,2)	8 (61,5)
V_H4 (%)	3 (10,7)	8 (40,0)	2 (8,3)	2 (15,4)
V_H5 (%)	0 (0,0)	1 (5,0)	2 (8,3)	2 (15,4)

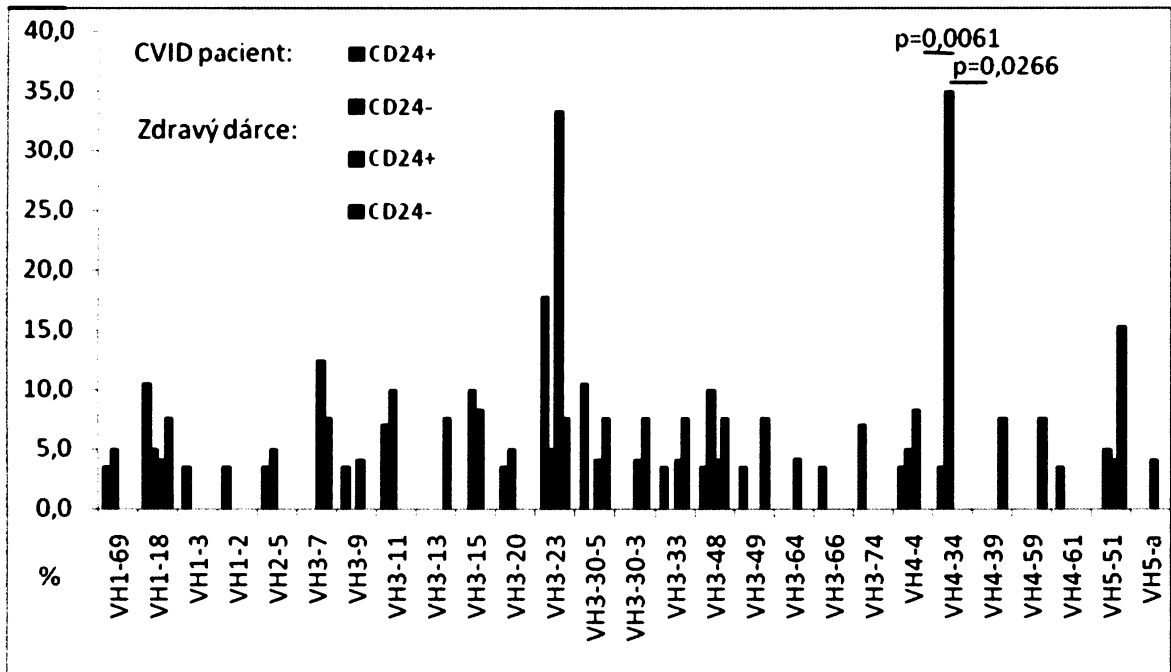
Tab. 16: Počet a poměrné zastoupení jednotlivých V_H genových rodin v populacích CD24⁺ a CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce.

5.3.3.2 Zastoupení V_H genových segmentů

V transkriptech detekovaných v B lymfocytech obou sledovaných populací byla detekována přítomnost celé škály různých V_H segmentů (obr. 14, tab. 17). Nejčastěji byly v populaci CD24⁺ B lymfocytů CVID pacienta nalezeny genové segmenty V_H3-23 (5 z 28 transkriptů; 17,8%), V_H1-18 a V_H3-30-5 (shodně 3 z 28 transkriptů; 10,6%). V populaci CD24⁻ B lymfocytů byly nejčastěji přítomen genový segment V_H4-34 (7 z 20 transkriptů; 35,0%).

V populaci CD24⁺ B lymfocytů zdravého dárce byly nejčastěji detekovány genové segmenty V_H3-23 (8 z 24 transkriptů; 33,3%) a V_H3-7 (3 z 23 transkriptů; 12,5%), v populaci CD24⁻ pak segment V_H5-51 (2 ze 13 transkriptů; 15,4%). V žádné z populací zdravého dárce nebyl nalezen segment V_H4-34.

Pomocí Fisherova exaktního testu jsme prokázali statisticky významně vyšší zastoupení segmentu V_H4-34 v populaci CD24⁺ oproti populaci CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta (35,0% vs. 3,6%, p=0,0061). Výše uvedená absence tohoto segmentu v transkriptech buněk zdravého dárce byla statisticky významná v jeho populaci CD24⁻ B lymfocytů ve srovnání se stejnou populací CVID pacienta (0% vs. 35%; p=0,0266).



Obr. 14: Zastoupení jednotlivých V_H genových segmentů v populacích CD24⁺ a CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce.

V _H gen	CVID pacient		Zdravý dárce	
	CD24 ⁺	CD24 ⁻	CD24 ⁺	CD24 ⁻
V _H 1-69 (%)	1 (3,6)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 1-18 (%)	3 (10,6)	1 (5,0)	1 (4,2)	1 (7,7)
V _H 1-3 (%)	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 1-2 (%)	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 2-5 (%)	1 (3,6)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 3-7 (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (12,5)	1 (7,7)
V _H 3-9 (%)	1 (3,6)	0 (0,0)	1 (4,2)	0 (0,0)
V _H 3-11 (%)	2 (7,1)	2 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 3-13 (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,7)
V _H 3-15 (%)	0 (0,0)	2 (10,0)	2 (8,3)	0 (0,0)
V _H 3-20 (%)	1 (3,6)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 3-23 (%)	5 (17,8)	1 (5,0)	8 (33,3)	1 (7,7)
V _H 3-30-5 (%)	3 (10,6)	0 (0,0)	1 (4,2)	1 (7,7)
V _H 3-30-3 (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,2)	1 (7,7)
V _H 3-33 (%)	1 (3,6)	0 (0,0)	1 (4,2)	1 (7,7)
V _H 3-48 (%)	1 (3,6)	2 (10,0)	1 (4,2)	1 (7,7)
V _H 3-49 (%)	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,7)
V _H 3-64 (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,2)	0 (0,0)
V _H 3-66 (%)	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 3-74 (%)	2 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 4-4 (%)	1 (3,6)	1 (5,0)	2 (8,3)	0 (0,0)
V _H 4-34 (%)	1 (3,6)	7 (35,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 4-39 (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,7)
V _H 4-59 (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,7)
V _H 4-61 (%)	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
V _H 5-51 (%)	0 (0,0)	1 (5,0)	1 (4,2)	2 (15,4)
V _H 5-a (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,2)	0 (0,0)

Tab. 17: Počet a poměrné zastoupení V_H genových segmentů v populacích CD24⁺ a CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce.

5.3.3.3 Zastoupení D_H genových rodin

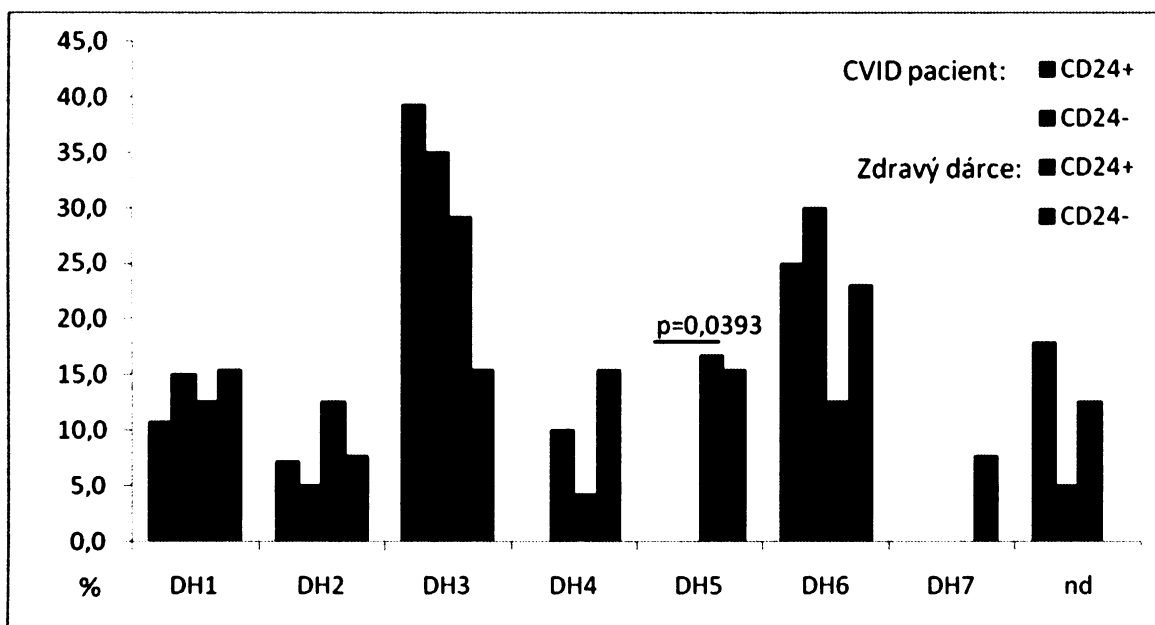
V transkriptech získaných z B lymfocytů obou sledovaných populací CVID pacienta byly detekovány jednotlivé D_H genové rodiny v podobném poměrném zastoupení (obr. 15, tab. 18). V populaci CD24⁺ B lymfocytů CVID pacienta jsme zjistili přítomnost genových rodin D_H1 – D_H3 a D_H6, v populaci CD24⁻ pak rodiny D_H1 – D_H4 a D_H6. V obou populacích B buněk zdravého dárce jsme zaznamenali genové rodiny D_H1 – D_H6, v populaci CD24⁻ pak navíc i rodinu D_H7. V detekovaných IgM transkriptech nebyly nalezeny žádné segmenty rodiny D_H5.

Nejčastěji byly v B lymfocytech obou populací CVID pacienta nalezeny genové segmenty rodin D_H3 a D_H6. Segmenty rodiny D_H3 byly zaznamenány v 39,3% případů (11 transkriptů z 28) buněk populace CD24⁺ B lymfocytů a 35,0% případů (7 z 20

transkriptů) buněk populace CD24⁻ B lymfocytů. Přítomnost segmentů rodiny D_H6 jsme zjistili v 25,0% případů (7 z 24 transkriptů) buněk populace CD24⁺ a ve 30,0% případů (6 z 20 transkriptů) buněk populace CD24⁻.

V buňkách populace CD24⁺ B lymfocytů zdravého dárce byly nejčastěji objeveny segmenty rodiny D_H3 (7 z 24 transkriptů; 29,2%) a D_H5 (4 z 24 transkriptů; 16,7%). V populaci CD24⁻ B lymfocytů pak byly nejčastěji detekovány segmenty rodiny D_H6 (3 ze 13 transkriptů; 23,1%).

Absence segmentů D_H5 rodiny u zdravého dárce byla statisticky významná v případě jeho populace CD24⁺ B lymfocytů ve srovnání s stejnou populací B lymfocytů CVID pacienta (0,0% vs. 16,7% u CVID pacienta, p=0,0393).



Obr. 15: Zastoupení D_H genových rodin v populacích CD24⁺ a CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce, (nd = nedefinované segmenty, not defined).

D_H rodina	CVID pacient		Zdravý dárce	
	CD24⁺	CD24⁻	CD24⁺	CD24⁻
D_H1 (%)	3 (10,7)	3 (15,0)	3 (12,5)	2 (15,4)
D_H2 (%)	2 (7,1)	1 (5,0)	3 (12,5)	1 (7,7)
D_H3 (%)	11 (39,3)	7 (35,0)	7 (29,2)	2 (15,4)
D_H4 (%)	0 (0,0)	2 (10,0)	1 (4,2)	2 (15,4)
D_H5 (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (16,7)	2 (15,4)
D_H6 (%)	7 (25,0)	6 (30,0)	3 (12,5)	3 (23,1)
D_H7 (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (7,7)
nd (%)	5 (17,9)	1 (5,0)	3 (12,5)	0 (0,0)

Tab. 18: Počet a poměrné zastoupení D_H genových rodin v populacích CD24⁺ a CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce, (nd = nedefinované segmenty, not defined).

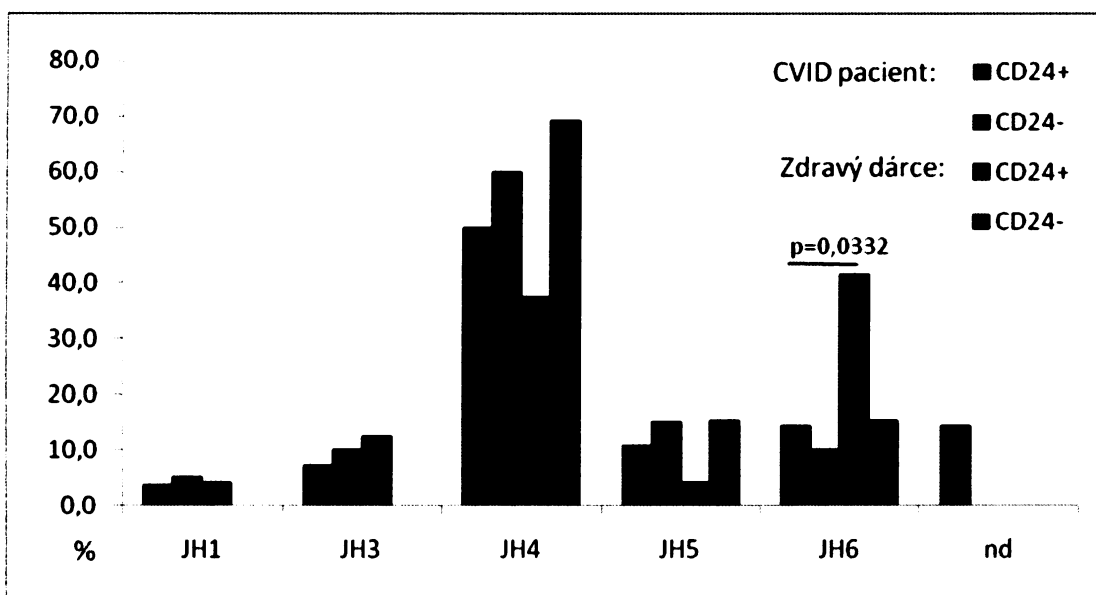
5.3.3.4 Zastoupení J_H genových segmentů

V transkriptech detekovaných v B lymfocytech obou sledovaných populací CVID pacienta i zdravého dárce jsme detekovali zastoupení jednotlivých J_H genových segmentů opět v podobném poměru (obr. 16, tab. 19).

Výrazně nejčastěji byly v buňkách obou sledovaných populací CVID pacienta nalezeny segmenty J_H4 (14 z 28 transkriptů; 50,0% v populaci CD24⁺ a 12 z 20; 60,0% v populaci CD24⁻).

V populaci CD24⁺ zdravého dárce jsme nejčastěji detekovali segmenty J_H6 (10 z 24 transkriptů; 41,7%) a J_H4 (9 z 24; 37,5%). V buňkách populace CD24⁻ B lymfocytů pak výrazně převažoval segment J_H4 (9 ze 13; 69,2%).

Pomocí Fisherova exaktního testu jsme zjistili statisticky významně vyšší zastoupení J_H6 segmentu v CD24⁺ B lymfocytech zdravého dárce oproti stejné populaci B lymfocytů CVID pacienta (41,7% vs. 14,3%; p=0,0332).



Obr. 16: Zastoupení J_H genových segmentů v populacích CD24⁺ a CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce, (nd = nedefinované segmenty, not defined).

	CVID pacient		Zdravý dárce	
	CD24+	CD24-	CD24+	CD24-
J_H1 (%)	1 (3,6)	1 (5,0)	1 (4,2)	0 (0,0)
J_H3 (%)	2 (7,1)	2 (10,0)	3 (12,5)	0 (0,0)
J_H4 (%)	14 (50,0)	12 (60,0)	9 (37,5)	9 (69,2)
J_H5 (%)	3 (10,7)	3 (15,0)	1 (4,2)	2 (15,4)
J_H6 (%)	4 (14,3)	2(10,0)	10 (41,7)	2 (15,4)
nd (%)	4 (14,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Tab. 19: Počet a poměrné zastoupení J_H genových segmentů v populacích CD24⁺ a CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce, (nd = nedefinované segmenty, not defined).

5.3.3.5 Mutační frekvence

Průměrná mutační frekvence V_H genových segmentů detekovaných v populaci CD24⁺ B lymfocytů byla 2,5% ($\pm 2,2\%$), v populaci CD24⁻ B lymfocytů pak 0,5% ($\pm 0,9\%$) pro B lymfocyty CVID pacienta. V transkriptech získaných z buněk populace CD24⁺ B lymfocytů zdravého dárce jsme zaznamenali V_H genové segmenty, jejichž průměrná mutační frekvence byla 1,8% ($\pm 2,2\%$). Průměrná mutační frekvence V_H segmentů detekovaných v transkriptech z buněk populace CD24⁻ B lymfocytů zdravého dárce pak byla 2,2% ($\pm 2,0$; tab. 20, obr. 17).

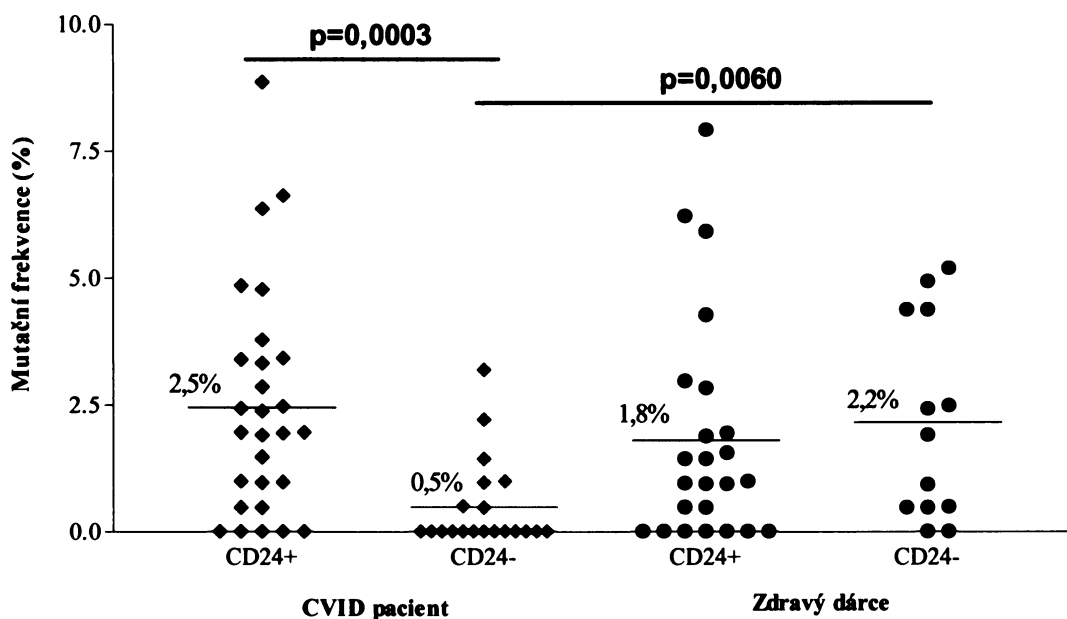
Za somaticky mutované byly považovány V_H segmenty obsahující více než 2% mutací (Brezinschek *et al.*, 1997). U populace CD24⁺ B lymfocytů CVID pacienta tedy

bylo podle tohoto kritéria mutováno 46,4% V_H segmentů (13 z 28), zatímco u populace CD24⁻ B lymfocytů to bylo jen 10,0% V_H segmentů (2 z 20). V_H segmenty v populaci CD24⁺ zdravého dárce pak byly mutovány z 25,0% (6 z 24 segmentů) a V_H segmenty v populaci CD24⁻ pak byly mutovány ze 46,2% (6 ze 13).

Populace B lymfocytů	CVID pacient		Zdravý dárce	
	CD24 ⁺	CD24 ⁻	CD24 ⁺	CD24 ⁻
Průměrná mf V _H segmentů, ± sd (%)	2,5±2,2	0,5±0,9	1,8±2,2	2,2±2,0
Minimum – maximum mutací (%)	0 – 8,9	0 – 3,2	0 – 7,9	0 – 5,2
Počet V _H segmentů obsahující více než 2% mutací (%)	13 (46,4)	2 (10,0)	6 (25)	6 (46,2)
Počet V _H segmentů obsahující méně než 2% mutací (%)	15 (53,6)	18 (90,0)	18 (75)	7 (53,8)

Tab. 20: Mutační frekvence a počty mutovaných V_H segmentů, (sd=standardní odchylka, standard deviation, mf=mutační frekvence, mutational frequency).

Pomocí Mann-Whitneova neparametrického t-testu jsme prokázali statisticky významné rozdíly v mutačních frekvencích transkriptů V_H segmentů mezi populacemi CD24⁺ a CD24⁻ (průměr 2,5% vs. 0,5%; p=0,0003) CVID pacienta a také mezi populacemi CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta a stejnou populací zdravého dárce (průměr 0,5% vs. 2,2%; p=0,0060).



Obr. 17: Distribuce mutačních frekvencí v detekovaných V_H segmentech IgM transkriptů v populacích $CD24^+$ a $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce; vodorovné čáry vyznačují průměry.

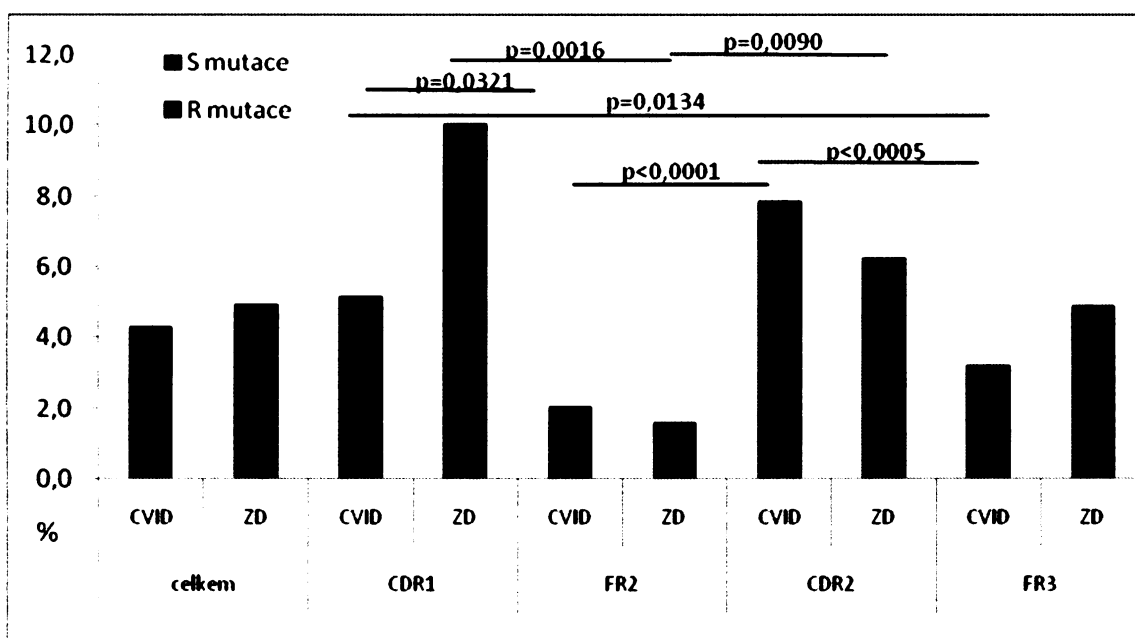
5.3.3.6 Distribuce záměnných a tichých mutací

Do hodnocení distribuce záměnných (replacement, R) a tichých (silent, S) mutací jsme zařadili jen V_H sekvence, které obsahovaly více než 2% mutací (Brezinschek *et al.*, 1997; tab. 20). Z obrázků 18 a 19 je patrné, že k mutacím docházelo častěji v CDR oblastech a to u obou populací CVID pacienta i zdravého dárce.

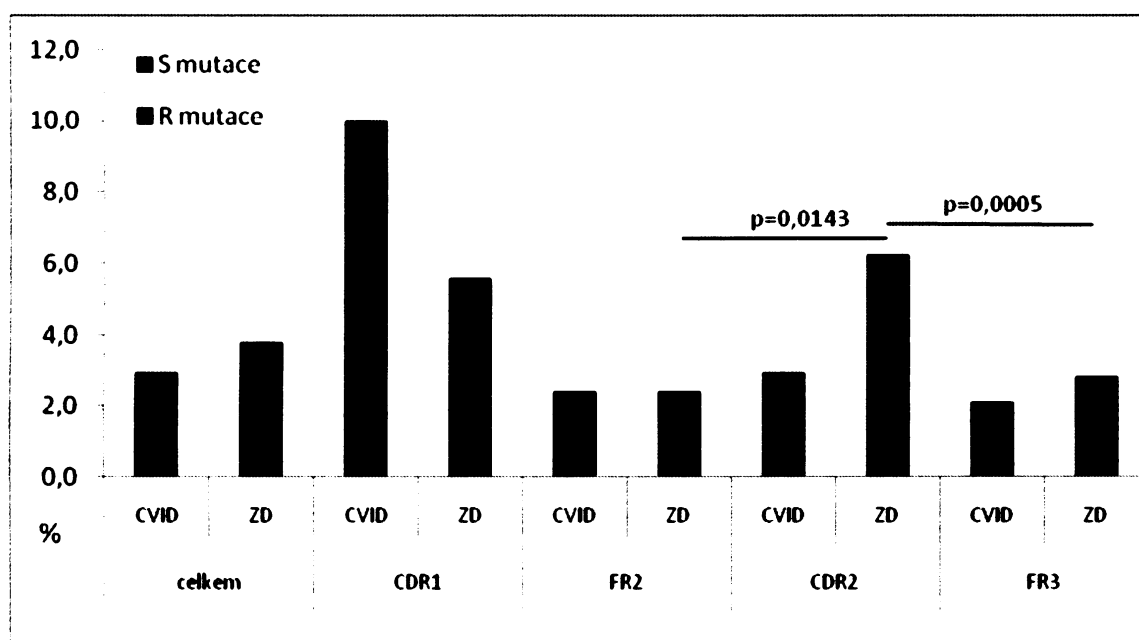
Pomocí Fisherova exaktního testu jsme ve V_H segmentech v populaci $CD24^+$ B lymfocytů CVID pacienta prokázali signifikantně častější výskyt R mutací v CDR2 oblasti ve srovnání s FR2 oblastí ($p < 0,0001$) i FR3 oblastí ($p < 0,0005$) a taky častější výskyt R mutací v CDR1 oblasti oproti oblastem FR2 ($p = 0,0321$) a FR3 ($p = 0,0134$, obr. 18).

Statisticky významné rozdíly v rozložení R mutací jsme zjistili také u populace $CD24^+$ B lymfocytů zdravého dárce a to mezi oblastmi CDR2 a FR2 ($p = 0,0090$) a CDR1 a FR2 ($p = 0,0016$) ve smyslu častějšího výskytu R mutací v CDR oblastech (obr. 18).

V populaci $CD24^-$ zdravého dárce jsme detekovali signifikantně častější výskyt R mutací v CDR2 oblasti oproti oblasti FR2 ($p = 0,0143$) a také v CDR2 oblasti ve srovnání s FR3 oblastí ($p = 0,0005$; obr. 19).



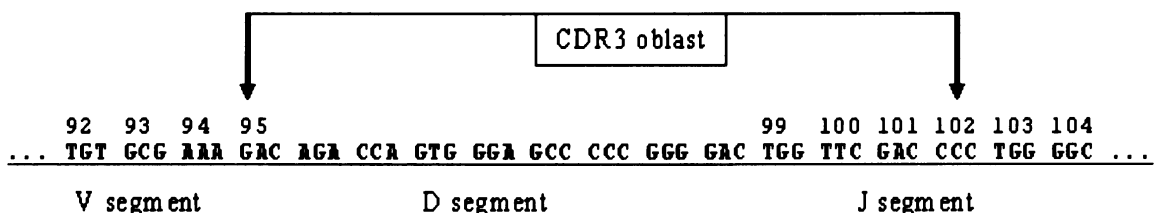
Obr. 18: Frekvence a distribuce záměnných (R) a tichých (S) mutací ve V_H genových segmentech v populaci $CD24^+$ B lymfocytů CVID pacienta (CVID) a zdravého dárce (ZD).



Obr. 19: Frekvence a distribuce záměnných (R) a tichých (S) mutací ve V_H genových segmentech v populaci $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta (CVID) a zdravého dárce (ZD).

5.3.3.7 Distribuce délek CDR3 oblastí

CDR3 oblast těžkého řetězce imunoglobulinu je určena sekvencí mezi 95. a 102. kodonem (včetně těchto kodonů), tj. mezi 3'koncem V_H segmentu a 5'koncem J_H segmentu (Ivanov *et al.*, 2005; obr. 20). 95. kodon se u většiny V_H segmentů skládá ze dvou nukleotidů, které jsou součástí V_H segmentu a jednoho nukleotidu, který je již součástí D_H segmentu. V této oblasti často dochází díky aktivitě DNA exonukleázy k odstranění několika nukleotidů, a to i z předchozích kodonů V_H segmentu a následně pak k adici náhodných nebo palindromických nukleotidů, které nejsou kódovány zárodečnou sekvencí DNA. Pokud byly exonukleázou odstraněny některé nukleotidy ze 3'konce V_H segmentu, byl za jeho konec považován ten kodon, který aktivitou exonukleázy nebyl pozměněn, a následující kodon byl považován za začátek CDR3 oblasti.

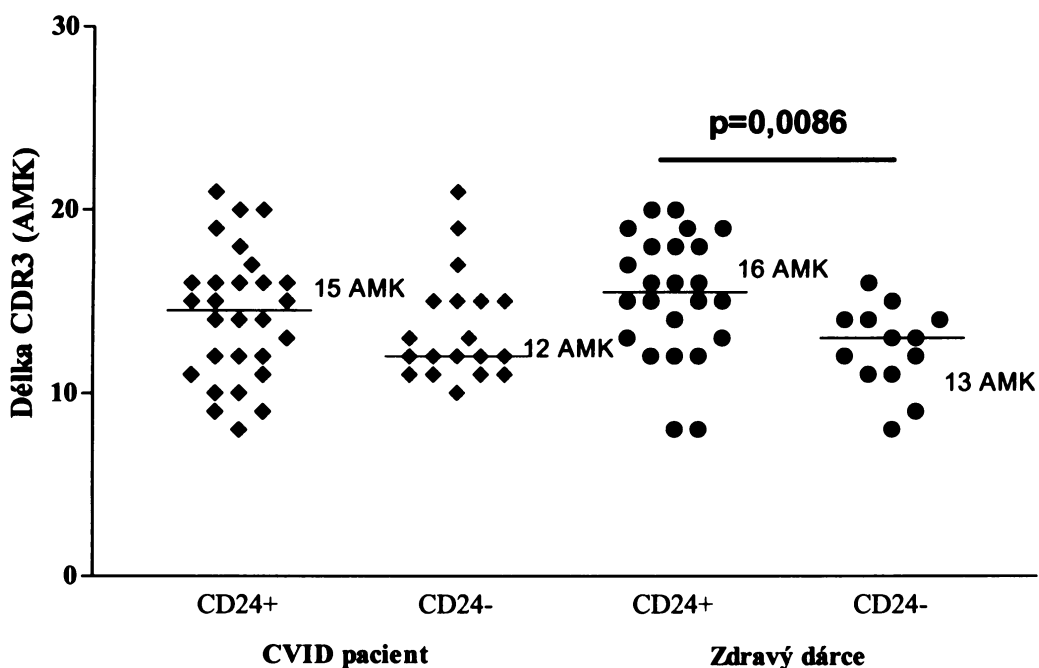


Obr. 20: Příklad vymezení CDR3 oblasti IgH řetězce.

Délky CDR3 oblastí jednotlivých transkriptů těžkých řetězců imunoglobulinů detekovaných ve sledovaných populacích buněk se pohybovaly mezi 8 až 21 AMK (medián $15 \pm 0,67$ AMK) pro populaci CD24⁺ B lymfocytů a mezi 10 až 21 AMK (medián $12 \pm 0,65$ AMK) pro populaci CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta (obr. 21).

V B lymfocytech zdravého dárce byly nalezeny transkripty těžkých řetězců imunoglobulinů, jejichž délka CDR3 oblastí se pohybovala mezi 6 až 20 AMK (medián $16 \pm 0,69$ AMK) u populace CD24⁺ a mezi 8 až 16 AMK u populace CD24⁻ (medián $13 \pm 0,64$ AMK).

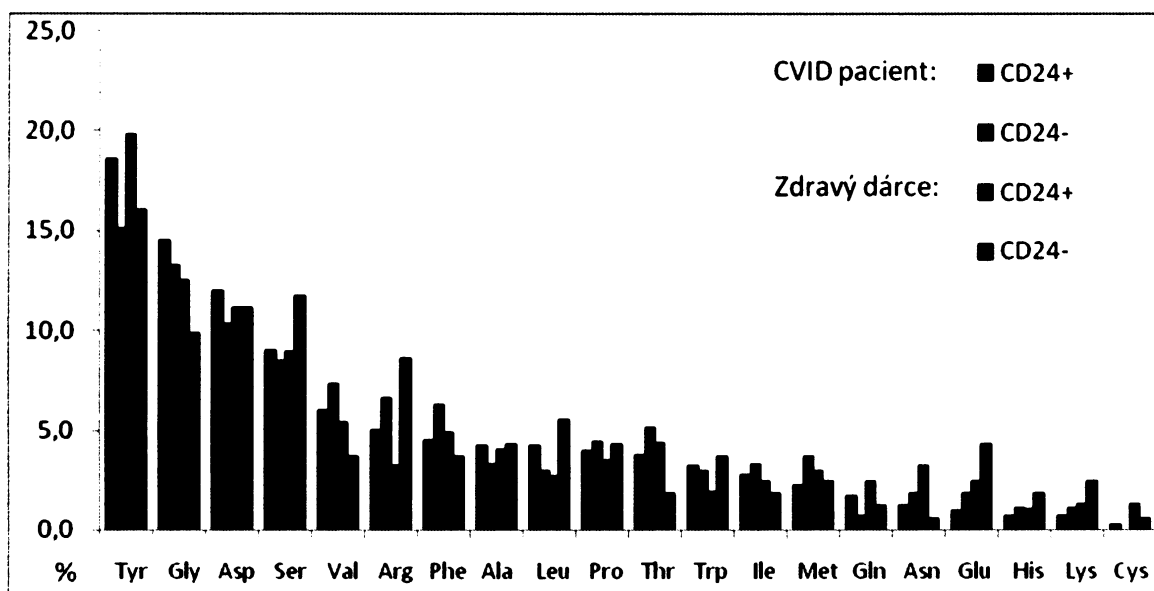
Pomocí Mann-Whitneova neparametrického t-testu jsme zjistili statisticky významný rozdíl v distribuci délek CDR3 oblastí detekovaných transkriptů a to mezi populacemi CD24⁺ B lymfocytů a CD24⁻ B lymfocytů zdravého dárce (medián 16 vs. 13 AMK; $p=0,0086$).



Obr. 21: Délka CDR3 oblastí populací CD24⁺ a CD24⁻ B lymfocytů u CVID pacienta a zdravého dárce (vodorovné čáry vyznačují mediány).

5.3.3.8 Aminokyselinové složení CDR3 oblastí

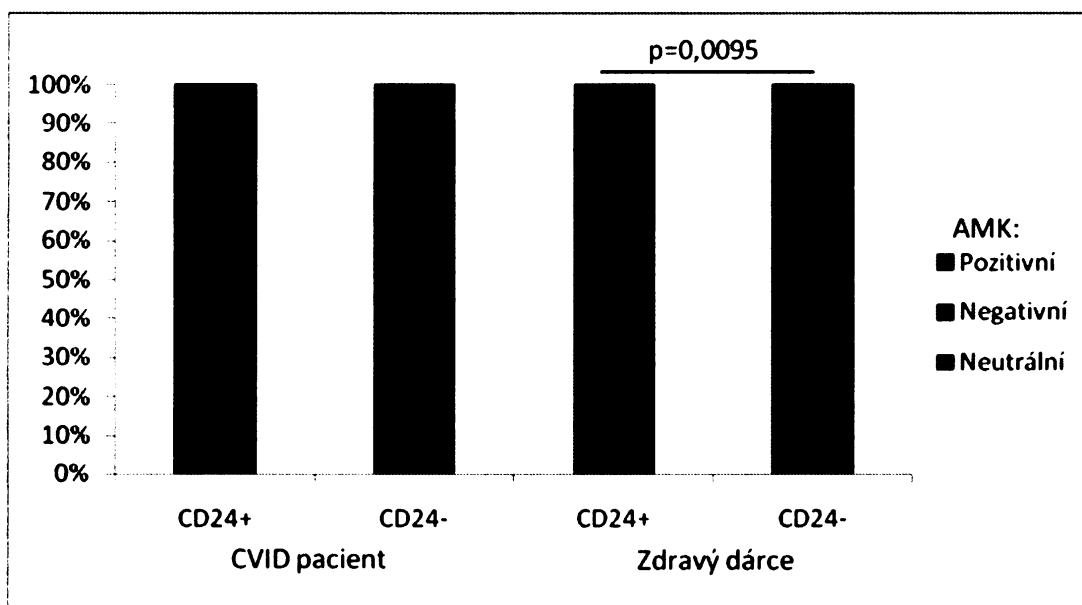
Získané nukleotidové sekvence CDR3 oblastí byly převedeny do sekvencí aminokyselin pomocí statistického softwaru BioEdit verze 7.0.0. Zastoupení jednotlivých aminokyselin v CDR3 oblastech imunoglobulinů tvořených námi sledovanými populacemi B lymfocytů CVID pacienta i zdravého dárce se velmi podobají (obr. 22). Nejčastěji byl v CDR3 oblastech zaznamenán výskyt aminokyselin tyrosinu, glycinu, asparaginu a serinu.



Obr. 22: Relativní zastoupení aminokyselin v CDR3 oblastech transkriptů imunoglobulinů tvořených sledovanými populacemi B lymfocytů.

Zastoupení pozitivně a negativně nabitých a neutrálních aminokyselin v CDR3 oblastech detekovaných transkriptů těžkých řetězců imunoglobulinů tvořených námi sledovanými populacemi B lymfocytů CVID pacienta i zdravého dárce se rovněž velmi podobají (obr. 23). Neutrální aminokyseliny tvoří přibližně 70 – 80% aminokyselin CDR3 oblastí, negativně nabité aminokyseliny tvoří 12 – 15% a pozitivně nabité aminokyseliny zbývajících 6 – 13% aminokyselin CDR3 oblastí.

Pomocí Fisherova exaktního testu jsme zjistili statisticky významně nižší podíl pozitivně nabitých aminokyselin v CDR3 oblastech transkriptů získaných z buněk populace CD24⁺ B lymfocytů zdravého dárce oproti populaci CD24⁻ B lymfocytů zdravého dárce (5,7% vs. 13%, $p=0,0095$). Podobné snížení je patrné také mezi stejnými B buněčnými populacemi pacienta s CVID (6,5% vs. 8,9%), v tomto případě však rozdíl nedosáhl statistické významnosti.



Obr. 23: Relativní zastoupení pozitivně a negativně nabitých a neutrálních AMK v CDR3 oblastech detekovaných transkriptů imunoglobulinů.

5.3.4 Analýza $V_H D_H J_H$ přeskupení v transkriptech pro izotyp IgG

V buňkách populace $CD24^+$ CVID pacienta byl z celkového počtu 29 detekovaných transkriptů 1 transkript izotypu IgG, v buňkách populace $CD24^-$ to pak byly 3 transkripty z 23 (tab. 15). U obou sledovaných populací B lymfocytů CVID pacienta byly všechny IgG transkripty detekovány v buňkách, ve kterých jsme zjistili také přítomnost transkriptů izotypu IgM. Mutační frekvence V_H segmentů jednotlivých transkriptů IgM a IgG byla zcela identická. Vlastnosti $V_H D_H J_H$ přeskupení IgG transkriptů shrnuje tabulka 21.

vzorek č.	populace	V_H rodina	V_H genový lokus	V_H gen (název)	D_H genový lokus	D_H gen (název)	J_H gen (název)	mf (%)	Délka CDR3 (AMK)
1A	$CD24^+$	V_H3	3-23	DP-47/V3-23	5-12	D5-12/DK1	J_H4b	4,9	8
8C	$CD24^-$	V_H1	1-18	DP-14/V1-18+	3-09	D3-9/DXP1	J_H5b	0,5	21
9G	$CD24^-$	V_H4	4-34	DP-63/VH4.21	5-05	D5-5/DK4	J_H4b	0,0	13
12E	$CD24^-$	V_H5	5-51	DP-73/V5-51	2-08	D2-8/DLR1	J_H3b	3,2	11

Tab. 21: Využití V_H , D_H a J_H segmentů, mf (mutační frekvence) a délka CDR3 oblasti transkriptů izotypu IgG tvořených B lymfocyty CVID pacienta.

U zdravého dárce byl v buňkách populace $CD24^+$ B lymfocytů z celkového počtu 25 nalezených transkriptů 1 transkript izotypu IgG, u populace $CD24^-$ to bylo 6 transkriptů z 19 (tab. 15).

Na rozdíl od CVID pacienta byly IgG transkripty v B lymfocytech zdravého dárce detekovány v buňkách, ve kterých jsme přítomnost transkriptů izotypu IgM nezaznamenali. Vlastnosti $V_H D_H J_H$ přeskupení IgG transkriptů shrnuje tabulka 22. Průměrná mutační frekvence V_H segmentů IgG transkriptů v populaci $CD24^-$ byla $2,8 \pm 1,7\%$ a pohybovala se od 0 do 5,2%.

vzorek č.	populace	V_H rodina	V_H genový lokus	V_H gen (název)	D_H genový lokus	D_H gen (název)	J_H gen (název)	mf (%)	Délka CDR3 (AMK)
6A	$CD24^+$	VH1	1-69	DP-10/hv1051	2-15	D2-15/D2	J_H4a	2,4	19
7C	$CD24^-$	VH5	5-a	VH32Sanz+	5-12	D5-12/DK1	J_H5a	2,9	7
7H	$CD24^-$	VH5	5-a	VH32Sanz+	5-12	D5-12/DK1	J_H5a	2,9	7
10A	$CD24^-$	VH3	3-30-5	DP-49/1.9III	1-26	D1-26	J_H4b	2,8	12
10B	$CD24^-$	VH3	3-15	DP-38/9-1	6-06	D6-6/DN4	J_H4b	0,0	11
10H	$CD24^-$	VH2	2-70	S12-10	nd	nd	nd	5,2	13
12H	$CD24^-$	VH1	1-03	DP-25/VI-3b+	2-02	D4	J_H5b	3,3	18

Tab. 22: Využití V_H , D_H a J_H segmentů, mf (mutační frekvence) a délka CDR3 oblasti transkriptů izotypu IgG tvořených B lymfocyty zdravého dárce; nd=nedefinované údaje, not defined.

5.3.5 Klonální příbuznost

Mezi detekovanými transkripty těžkých řetězců imunoglobulinů izotypu IgM ve sledovaných populacích B lymfocytů CVID pacienta ani zdravého dárce jsme nenalezli žádné identické transkripty, jejichž přítomnost by naznačovala klonální příbuznost B lymfocytů.

Dva identické transkripty izotypu IgG jsme našli v populaci $CD24^-$ zdravého dárce, (obr. 24., vzorky č. 7C a 7H).

	3' konec V_H segmentu (5-a)	D_H segment (5-12) CDR3 oblast	5' konec J_H segment (5a)
Vzorek č. 7C:	TGT GCG AGA GAG TAT AGG GGC TAC GAT TCT TGG GGC CAG GGA ACC		
Vzorek č. 7H:	TGT GCG AGA GAG TAT AGG GGC TAC GAT TCT TGG GGC CAG GGA ACC		

Obr. 24: Nukleotidová sekvence CDR3 oblastí (červeně) transkriptů č. 7C a 7H.

6 Diskuze

6.1 Analýza frekvencí B buněčných populací $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ průtokovým cytometrem

Metodou průtokové cytometrie byla u skupiny CVID pacientů, v porovnání se skupinou zdravých dárců, detekována signifikantně zvýšená frekvence dvou doposud nepopsaných populací periferních B lymfocytů. Jednalo se o populace $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ (dále jako $CD24^+$) a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ (dále jako $CD24^-$).

V krvi některých CVID pacientů byla již dříve nalezena expandovaná populace $CD19^{++}CD27^-CD21^{low}CD38^{low}IgM^+$ B lymfocytů, která se v krvi zdravých dárců vyskytuje vzácně (Wehr *et al.*, 2008; Warnatz a Schleiser, 2008). Je pravděpodobné, že rozšířením panelu sledovaných znaků o marker CD24 jsme byli schopni uvedenou populaci ještě lépe charakterizovat a tím rozdělit na dvě subpopulace.

6.2 Analýza genů pro variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů jednotlivých buněk z populací $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ B lymfocytů

Protože populace $CD24^+$ ani $CD24^-$ B lymfocytů nebyly doposud popsány, bylo cílem této práce provést prvotní molekulární charakteristiku variabilních oblastí těžkých řetězců imunoglobulinů tvořených buňkami těchto populací B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce na úrovni mRNA.

Obě populace byly před zahájením studie považovány za naivní B buňky, jelikož nenesou na svém povrchu molekulu CD27 obecně považovanou za typický marker paměťových B lymfocytů, které prošly antigenem řízenou selekcí v germinálních centrech (Klein *et al.*, 1998). Naše nálezy však naznačují, že obě sledované populace B lymfocytů prošly antigenní stimulací a germinální reakcí, i když molekulu CD27 na svém povrchu neexprimují a vykazují spíše znaky paměťových B buněk. Nejednalo by se o první takový případ, protože již byla popsána minoritní populace periferních

B lymfocytů s fenotypem CD27⁺IgG⁺, která rovněž nese znaky antigenní stimulace (Fecteau *et al.*, 2006).

6.2.1 Distribuce transkriptů mRNA izotypů IgM a IgG v jednotlivých populacích

Ve sledovaných populacích B lymfocytů CVID pacienta i zdravého dárce jsme detekovali přítomnost transkriptů izotypů IgM i IgG, přičemž transkripty IgM výrazně převažovaly. V populacích CD24⁻ B lymfocytů CVID pacienta i zdravého dárce jsme detekovali více transkriptů IgG izotypu než v populacích CD24⁺ B lymfocytů. Statistické významnosti dosáhl tento rozdíl jen u populací zdravého dárce, což by napovídalo, že jsou buňky populace CD24⁻ B lymfocytů vyzrálejší než buňky populace CD24⁺ B lymfocytů.

6.2.2 Analýza V_HD_HJ_H přeskupení v transkriptech pro izotyp IgM

S pomocí statistických metod jsme zhodnotili zastoupení V_H, D_H a J_H genových rodin, mutační frekvence a vlastnosti CDR3 oblastí v transkriptech izotypu IgM detekovaných ve sledovaných populacích B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce.

6.2.2.1 Zastoupení V_H genových rodin

IgH genový lokus na lidském chromozomu 14 může u jednotlivce obsahovat až 51 funkčních V_H genových segmentů rozdělených do sedmi V_H rodin (tab. 23). Interpersonální rozdíly jsou způsobeny možnou přítomností nefunkčních alel některých segmentů. Úplný seznam V_H genových segmentů a jejich alel je volně přístupný v databázi www.imgt.org.

	V _H 1	V _H 2	V _H 3	V _H 4	V _H 5	V _H 6	V _H 7
Funkční segmenty (%)	10 (20,4)	3 (6,1)	21 (42,9)	11 (22,5)	2 (4,1)	1 (2,0)	1 (2,0)

Tab. 23: Počet funkčních V_H segmentů (sestaveno podle www.imgt.org).

Během rekombinačního procesu, kterým prochází B lymfocyty v kostní dřeni, dochází ke zcela náhodnému výběru V_HD_HJ_H segmentů. Ty pak vytvoří genové

uskupení, jež je jako varibailní oblast těžkých řetězců imunoglobulinů přepisováno do mRNA a následně do proteinu.

Poměrné zastoupení jednotlivých V_H rodin ve $V_H D_H J_H$ přeskupeních v maturovaných B buňkách pak při normálním stavu imunitního systému odpovídá zárodečnému repertoáru V_H rodin, i když s dalším vývojem populace B buněk může docházet k mírným změnám (Brezinschek *et al.*, 1997; Tsuiji *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2007). K výraznějším odchýlkám může docházet při některých chorobách imunitního systému (Morutza *et al.*, 2001; Bahler *et al.*, 1997).

V tomto smyslu zastoupení V_H genových rodin v transkriptech získaných z obou sledovaných populací B lymfocytů CVID pacienta i zdravého dárce odpovídá komplexitě zárodečných segmentů (χ^2 test, $p=0,0001$).

Při porovnání zastoupení jednotlivých V_H rodin mezi sledovanými populacemi B lymfocytů jsme zjistili signifikantně častější zastoupení segmentů rodiny V_{H4} v transkriptech získaných z buněk populace $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta oproti populaci $CD24^+$ B lymfocytů CVID pacienta.

Genové segmenty rodiny V_{H4} často kódují autoprotilátky, a proto jsou B lymfocyty s tímto segmentem ve $V_H D_H J_H$ přestavbách předmětem negativní selekce (Stewart *et al.*, 1992). Častěji jsou tedy segmenty V_{H4} rodiny detekovány ve $V_H D_H J_H$ přestavbách naivních buněk, zatímco po průchodu germinální reakcí se v mutovaných $V_H D_H J_H$ přestavbách tato rodina objevuje již v podstatně menším poměru.

Naše nálezy jsou v souladu s výše uvedeným a naznačují, že populace $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta je méně vyzrálší než populace $CD24^+$ B lymfocytů.

6.2.2.2 Zastoupení V_H genových segmentů

Specifita protilátek je na úrovni proteinu dána sekvencí aminokyselin a potažmo trojrozměrnou strukturou vazebního místa pro antigen, na úrovni nukleových kyselin je pak určena pořadím nukleotidů kódujících jednotlivé aminokyseliny. O specifitě budoucího imunoglobulinu se tedy rozhoduje již při přeskupování genů a výběru jednotlivých V_H , D_H a J_H segmentů těžkého řetězce i V_L a J_L segmentů lehkého řetězce. V této souvislosti byla popsána řada případů protilátek, které jsou namířeny proti určitým antigenům a využívají preferenčně konkrétní V_H genové segmenty (Gorny *et al.*, 2009; Lucas *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 1999; Weitkamp *et al.*, 2003).

Při srovnání zastoupení jednotlivých V_H segmentů ve $V_H D_H J_H$ přestavbách mezi sledovanými populacemi CVID pacienta a zdravého dárce jsme prokázali signifikantně častější zastoupení transkriptů segmentu V_{H4-34} v populaci $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta oproti populaci jeho $CD24^+$ B lymfocytů a také oproti populaci $CD24^-$ B lymfocytů zdravého dárce. Navíc poměrné zastoupení segmentu V_{H4-34} v transkriptech získaných z buněk populace $CD24^-$ CVID pacienta mezi ostatními segmenty bylo signifikantně častější, než by odpovídalo zárodečné konfiguraci (Fisherův exaktní test, $p=0,0005$).

Genový segment V_{H4-34} kóduje variabilní část Ig řetězce autoprotilátek namířených například proti červeným krvinkám. Tento segment se však častěji vyskytuje v nemutovaných $V_H D_H J_H$ přestavbách zatímco v B buněčných populacích, které prošly somatickou hypermutací je zastoupení V_{H4-34} naopak menší než očekávané, zřejmě z důvodu delece B buněk exprimujících receptor kódovaný tímto segmentem (Brezinschek *et al.*, 1997).

Naše zjištění jsou v souladu s těmito fakty, protože ze 7 detekovaných transkriptů V_{H4-34} v populaci $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta obsahovaly mutace pouze dva transkripty, a průměrná mutační frekvence těchto sedmi segmentů byla jen 0,2%.

Dále jsme v transkriptech získaných z populací $CD24^+$ CVID pacienta i zdravého dárce zjistili signifikantně častější zastoupení segmentu V_{H3-23} , než by odpovídalo zárodečnému repertoáru funkčních segmentů (Fisherův exaktní test, $p=0,0219$ a $p=0,0004$).

Genový segment V_{H3-23} byl detekován ve $V_H D_H J_H$ přestavbách, které kódují protilátky namířené proti *Haemophilus influenzae* (Lucas *et al.*, 2003; Liu a Lucas, 2003). Je tedy možné, že některé buňky v naší sledované populaci $CD24^+$ B lymfocytů zdravého dárce i CVID pacienta byly ve vývoji stimulovány antigeny právě této bakterie.

6.2.2.3 Zastoupení D_H genových rodin

Ze sedmi D_H genových rodin jsme ve $V_H D_H J_H$ transkriptech získaných z obou sledovaných populací B lymfocytů CVID pacienta identifikovali nejčastěji segmenty rodin D_{H3} a D_{H6} . V buňkách populace $CD24^+$ B lymfocytů zdravého dárce byly nejčastěji objeveny transkripty segmentů rodiny D_{H3} a D_{H5} , v populaci $CD24^-$

B lymfocytů pak byly nejčastěji detekovány transkripty segmentů rodiny D_H6 . Část transkriptů D_H segmentů nebylo možné pojmenovat, což bylo zřejmě způsobeno aktivitou TdT, DNA exonukleázy a DNA polymerázy při rekombinačních procesech, popřípadě rozsáhlými somatickými hypermutacemi těchto segmentů.

Segmenty genových rodin D_H3 a D_H6 jsou nejčastěji zastoupené segmenty ve $V_H D_H J_H$ přeskupeních v periferních B lymfocytech různých vývojových stádií (Link a Schroeder, 2002; Tian *et al.*, 2007). Námi sledované populace se tedy z tohoto hlediska neodlišují od jiných populací periferních B lymfocytů.

6.2.2.4 Zastoupení J_H genových segmentů

J_H genové segmenty se liší svou délkou a výrazně ovlivňují i výslednou délku CDR3 oblasti. K celkové délce CDR3 oblasti přispívá J_H6 segment až devíti AMK, segmenty J_H1 a J_H2 šesti AMK, J_H5 pěti AMK, a segmenty J_H3 a J_H4 čtyřmi AMK. Ve $V_H D_H J_H$ přeskupeních naivních B lymfocytů je častěji přítomen delší genový segment J_H6 a méně často kratší segment J_H4 . Zcela opačná situace je pak u populací B buněk, které již prošly germinální reakcí (Brezinschek *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2007; Tsuiji *et al.*, 2006).

V transkriptech získaných z buněk obou sledovaných populací CVID pacienta a z buněk populace $CD24^-$ zdravého dárce jsme zjistili preferenci pro segmenty J_H4 . Populace $CD24^+$ zdravého dárce pak s podobnou frekvencí využívala genové segmenty J_H6 a J_H4 . Zjistili jsme signifikantně méně časté zastoupení J_H6 segmentů v transkriptech získaných z buněk $CD24^+$ B lymfocytů CVID pacienta oproti stejné populaci zdravého dárce.

Můžeme tedy konstatovat, že námi sledovaná populace $CD24^+$ B lymfocytů zdravého dárce se jeví jako méně vyzrálší při srovnání se stejnou populací B buněk CVID pacienta.

6.2.2.5 Mutační frekvence a distribuce záměnných a tichých mutací

Při antigenní stimulaci B lymfocytů dochází k intenzivním mutačním dějům ve variabilních oblastech genů pro těžké i lehké řetězce imunoglobulinů. K mutacím dochází po celé délce variabilních oblastí, avšak při antigenem řízené selekci B lymfocytů se mutace nacházejí preferenčně v CDR oblastech oproti FR oblastem.

Substituce nukleotidů, ke kterým dochází na úrovni DNA, mohou na úrovni proteinu způsobit záměnu aminokyseliny, pak se jedná o mutace záměnné (replacement, R), a nebo díky degeneraci genetického kódu k záměně aminokyseliny nedojde a mutace je tichá (silent, S). Pokud B lymfocyty prochází antigenní stimulací a selekcí, dochází k záměnným mutacím výrazně častěji v oblastech CDR než v FR oblastech (Müller-Hermelink a Greiner, 1998; Di Noia a Neuberger, 2007).

Určité procento mutací jsme zaznamenali v obou sledovaných populacích CVID pacienta i zdravého dárce. Prokázali jsme signifikantně vyšší mutační frekvenci v transkriptech V_H segmentů získaných z populace $CD24^+$ CVID pacienta oproti populaci $CD24^-$ CVID pacienta a také větší mutační frekvenci v transkriptech V_H segmentů detekovaných v populaci $CD24^-$ zdravého dárce oproti stejné populaci CVID pacienta.

Protože se v některých případech nemusí jednat o mutace způsobené antigenní stimulací B lymfocytů, ale o zárodečné polymorfismy, byly za somaticky mutované považovány V_H segmenty obsahující více než 2% mutací (Brezinschek *et al.*, 1997; Wlodarska *et al.*, 2007).

Podle tohoto kritéria tedy bylo mutováno 46,4% transkriptů V_H segmentů detekovaných v populaci $CD24^+$ B lymfocytů CVID pacienta, avšak v populaci $CD24^-$ B lymfocytů to bylo jen 10% V_H transkriptů. Rozložení mutací ve V_H segmentech transkriptů získaných z populace $CD24^+$ B lymfocytů CVID pacienta dokazuje, že jsou R mutace prokazatelně častěji přítomny v CDR oblastech než v oblastech FR.

Dohromady tato data naznačují, že u CVID pacienta populace $CD24^+$ B lymfocytů prošla nebo prochází větší antigenní stimulací než populace $CD24^-$ B buněk, zatímco u zdravého dárce je populace $CD24^-$ B lymfocytů antigenem stimulovaná podobně jako populace $CD24^+$ B lymfocytů, avšak významně více než populace $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta.

6.2.2.6 Distribuce délek CDR3 oblastí

Délka CDR3 oblastí imunoglobulinů se u dospělých jedinců obecně pohybuje v rozmezí 6 až 28 AMK (Link a Schroeder, 2002), přičemž kratší CDR3 oblasti obsahují $V_H D_H J_H$ přestavby v B lymfocytech, které již prošly antigenem stimulovanou somatickou hypermutací. CDR3 oblast hraje kritickou roli při rozpoznání a vazbě

antigenu a proto se předpokládá, že kratší CDR3 oblasti jsou schopny přesnější vazby antigenu než delší CDR3 oblasti (Rosner *et al.*, 2001).

Mediány délek CDR3 oblastí $V_H D_H J_H$ transkriptů v námi sledovaných populacích se pohybovaly v rozmezí 12 až 16 aminokyselin. Statisticky významně delší CDR3 oblasti jsme detekovali v transkriptech z buněk populace $CD24^+$ B lymfocytů zdravého dárce oproti populaci $CD24^-$ B lymfocytů zdravého dárce, což naznačuje, že $CD24^-$ B lymfocyty jsou vyvrážděnější než buňky populace $CD24^+$ B lymfocytů. Stejnou tendenci jsme pozorovali i u populací B buněk CVID pacienta, zde však hodnoty nedosáhly statistické významnosti.

6.2.2.7 Aminokyselinové složení CDR3 oblastí

Nejčastěji se v CDR3 oblastech imunoglobulinů obecně vyskytují neutrální, hydrofilní aminokyseliny tyrosin, glycin a serin. Naopak hydrofobní a nabitě aminokyseliny, zejména ty s pozitivním nábojem, jako je arginin, lysin a histidin, jsou poměrně vzácné (Link a Schroeder, 2002). Předpokládá se, že přítomnost nabitých aminokyselin by mohla narušit stabilitu těžkého řetězce imunoglobulinu, a jeho asociaci s lehkým řetězcem (Ippolito *et al.*, 2006). Nabitě aminokyseliny se často vyskytují v CDR3 oblastech autoreaktivních imunoglobulinů, a tím se vysvětluje, proč dochází během vývoje a selekce B lymfocytů ke snižování frekvence nabitých aminokyselin v CDR3 oblastech (Wardemann *et al.*, 2003).

Relativní zastoupení aminokyselin v CDR3 oblastech transkriptů imunoglobulinů tvořených námi sledovanými populacemi B lymfocytů CVID pacienta i zdravého dárce odpovídá uvedeným preferencím pro jednotlivé aminokyseliny. Zaznamenali jsme však signifikantně vyšší frekvenci pozitivně nabitých aminokyselin v CDR3 oblastech v transkriptech detekovaných v populaci $CD24^-$ B lymfocytů oproti populaci $CD24^+$ B lymfocytů zdravého dárce, což napovídá, že je populace $CD24^+$ B lymfocytů zdravého dárce v pokročilejším vývojovém stádiu než jeho populace $CD24^-$ B lymfocytů. U CVID pacienta jsme pozorovali podobnou tendenci, rozdíl však nebyl statisticky významný.

6.2.3 Analýza $V_H D_H J_H$ přeskupení v transkriptech pro izotyp IgG

U CVID pacienta byly všechny IgG transkripty detekovány v B lymfocytech, které také současně tvořily transkripty IgM. V těchto buňkách tedy došlo k izotypovému

přesmyku z prvotního IgM na IgG, avšak v buňkách ještě zůstaly přítomny transkripty IgM v detekovatelném množství.

Na rozdíl od CVID pacienta byly IgG transkripty v B lymfocytech zdravého dárce detekovány v buňkách, které již transkripty IgM netvořily. Tyto B lymfocyty tedy prošly izotypovým přesmykem do IgG a transkripty IgM v těchto buňkách byly degradovány. Průměrná mutační frekvence V_H transkriptů izotypu IgG detekovaných v populaci $CD24^-$ B lymfocytů zdravého dárce (2,8%) se příliš nelišila od mutační frekvence V_H transkriptů izotypu IgM stejné populace (2,2%).

Sledované populace B lymfocytů tedy obsahují buňky, které již prošly nebo procházejí izotypovým přesmykem, avšak většinu buněk tento proces doposud nezasáhl.

6.2.4 Klonální příbuznost

B lymfocyty odvozené od společného pozitivně selektovaného předchůdce, tzv. klony, vykazují stejnou specifitu protilátek, která se na úrovni DNA projevuje využitím identických V_H , D_H , J_H segmentů a tedy zcela shodnou sekvencí CDR3 oblastí (Clausen *et al.*, 1998). Vysoká frekvence výskytu takto klonálně příbuzných B buněk je typická pro leukemická a autoimunitní onemocnění.

Detekovali jsme pouze dva identické transkripty izotypu IgG a to v populaci $CD24^-$ zdravého dárce. Tento nálezn je však s největší pravděpodobností zcela náhodný a proto můžeme námi sledované populace B lymfocytů považovat za polyklonální.

7 Souhrn

Pomocí průtokové cytometrie byly u skupiny CVID pacientů detekovány dvě doposud nepopsané populace periferních B lymfocytů s fenotypem $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ (dále jako $CD24^+$) a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-(CD24^-)$. Frekvence buněk těchto populací v periferní krvi CVID pacientů byla signifikantně vyšší než u zdravých dárců.

Byla provedena molekulární analýza genů pro variabilní oblasti těžkých řetězců imunoglobulinů tvořených sledovanými populacemi $CD24^+$ a $CD24^-$ B lymfocytů jednoho CVID pacienta a jednoho zdravého dárce. S použitím statistických metod bylo zhodnoceno zastoupení V_H , D_H a J_H genových rodin, mutační frekvence a vlastnosti CDR3 oblastí v transkriptech izotypu IgM a IgG detekovaných ve sledovaných populacích B lymfocytů CVID pacienta a zdravého dárce.

Sledované populace byly před zahájením této práce považovány za naivní, pravděpodobně transientní B buňky a to zejména proto, že neexprimují na svém povrchu molekulu CD27 obecně považovanou za typický marker B lymfocytů, které již prošly germinální reakcí. Z tohoto pohledu jsou překvapující naše nálezy, naznačují, že uvedené populace již prošly antigenem řízenou stimulací a selekcí v germinálních centrech, i když molekulu CD27 na svém povrchu nenesou.

Ze sledovaných populací se jako nejvyzrálejší jeví buňky $CD24^-$ B lymfocytů zdravého dárce, ve kterých jsme detekovali největší poměrné zastoupení transkriptů izotypu IgG. Také výsledky analýz zastoupení J_H genových segmentů, délky CDR3 oblastí, mutační frekvence a distribuce R a S mutací svědčí pro to, že je tato populace zdravého dárce v pokročilejším vývojovém stádiu než populace $CD24^+$ B lymfocytů zdravého dárce a populace $CD24^-$ B lymfocytů CVID pacienta.

Při analýze transkriptů získaných z buněk populace $CD24^+$ B lymfocytů CVID pacienta jsme našli jak charakteristiky mluvící pro jejich větší vyzrálost oproti populaci $CD24^-$ (výrazně vyšší mutační frekvence, rozložení R a S mutací, menší zastoupení segmentů rodiny V_{H4} , větší zastoupení segmentů J_{H4} než J_{H6}), tak i výsledky tomu odporující (menší zastoupení transkriptů izotypu IgG, delší CDR3 oblast).

Celkově tyto závěry naznačují, že sledované populace B lymfocytů zřejmě hrají důležitou roli při regulaci homeostázy imunitního systému zdravých jedinců. V případě CVID onemocnění jsou zřejmě tyto buňky postiženy určitým defektem, který brání

jejich dalšímu vývoji a způsobuje jejich akumulaci v periferní krvi nebo na jiných místech organismu.

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^+$ a $CD19^+IgM^+CD27^-CD21^{low}CD38^{low}CD24^-$ B buněčné populace na molekulární úrovni pomocí analýzy variabilních oblastí genů pro těžké řetězce imunoglobulinů, což bylo splněno.

Výsledná charakteristika sledovaných populací je v mnoha směrech překvapující, a proto by další práce měla směřovat k detailnějšímu popisu těchto populací a hledání jejich biologických funkcí, což by mohlo vést k lepšímu pochopení COVID onemocnění.

8 Seznam citované literatury

1. Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H., Shinozaki K., Yamada S., Komiyama A. (1999): Plasma cell generation from B-lymphocytes via CD27/CD70 interaction. *Leukemia & Lymphoma* 35: 219-25.
2. Agematsu K., Nagumo H., Oguchi Y., Nakazawa T., Fukushima K., Yasui K., Ito S., Kobata T., Morimoto C., Komiyama A. (1998): Generation of Plasma Cells From Peripheral Blood Memory B Cells: Synergistic Effect of Interleukin-10 and CD27/CD70 Interaction. *Blood* 91: 173-180.
3. Aghamohammadi A., Mohammadi J., Parvaneh N., Rezaei N., Moin M., Espanol T., Hammarstrom L. (2008): Progression of Selective IgA Deficiency to Common Variable Immunodeficiency. *International archives of allergy and immunology* 147: 87–92.
4. Allman D., Lindsley R.C., DeMuth W., Rudd K., Shinton S.A., Hardy R.R. (2001): Resolution of Three Nonproliferative Immature Splenic B Cell Subsets Reveals Multiple Selection Points During Peripheral B Cell Maturation. *The Journal of Immunology* 167: 6834-6840.
5. Allman D., Srivastava B., Lindsley R.C. (2004): Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. *Immunological Reviews* 197: 147-160.
6. Arce S., Luger E., Muehlinghaus G., Cassesse G., Hauser A., Horst A., Lehnert K., Odendahl M., Honemann D., Heller K.-D., Kleinschmidt H., Berek C., Dorner T., Krenn V., Hiepe F., Bargou R., Radbruch A., Manz R.A. (2004): CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. *Journal of Leukocyte Biology* 75: 1023-1028.
7. Avery D.T., Kalled S.L., Ellyard J.I., Ambrose C., Bixler S.A., Thien M., Brink R., Mackay F., Hodgkin P.D., Tangye S.G. (2003): BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *The Journal of clinical investigation* 112: 286-97.
8. Bacchelli C., Buckridge S., Tharher A.J., Gaspar H.B. (2007): Translational Mini-Review Series on Immunodeficiency: Molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clinical and Experimental Immunology*, 149: 401 - 409.

9. Bahler D. W. , Miklos J.A., Swerdlow S.H. (1997): Ongoing Ig gene hypermutation in salivary gland mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas. *Blood* 89: 3335-44.
10. Barreto V.M., Ramiro A.R., Nussenzweig, M.C. (2005): Activation-induced deaminase: controversies and open questions. *Trends in Immunology*, 26:90-96.
11. Bartůňková J. (2002): *Imunodeficiency*. Grada Publishing, Praha.
12. Bernasconi N.L., Traggiai E., Lanzavecchia A. (2002): Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 298: 2199-202.
13. Brezinschek H.P., Foster S.J., Brezinschek R.I., Dörner T., Domiati-Saad R., Lipsky P.E. (1997): Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *The Journal of clinical investigation* 99: 2488-501.
14. Carsetti R. (2000): The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *The Journal of experimental medicine* 191: 5-8.
15. Carsetti R., Rosado M.M., Wardemann H. (2004): Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunological reviews* 197: 179-191.
16. Carter R.H., Fearon D.T. (1992): CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 256: 105-107.
17. Clausen B.E., Bridges S.L. Jr, Lavelle J.C., Fowler P.G., Gay S., Koopman W.J., Schroeder H.W. Jr (1998): Clonally-related immunoglobulin VH domains and nonrandom use of DH gene segments in rheumatoid arthritis synovium. *Molecular medicine* 4:240-57.
18. Darlow J.M., Stott D.I. (2004): VH replacement in rearranged immunoglobulin genes. *Immunology* 114: 155-165.
19. De La Concha E.G., Fernandez-Arquero M., Martinez A., Vidal F., Vigil P., Conejero L., Garcia-Rodriguez M.C., Fontan G. (1999): HLA class II homozygosity confers susceptibility to common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and experimental immunology* 116:516-20.
20. Di Noia J.M, Neuberger M.S. (2007): Molecular mechanism of antibody somatic hypermutation. *Annual review of biochemistry* 76: 1-22.

21. Di Renzo M., Pasqui A.L., Auteri A. (2004): Common variable immunodeficiency: a review. *Clinical and experimental medicine* 3: 211-217.
22. Dunn-Walters D.K., Isaacson P.G., Spencer J. (1995): Analysis of Mutations in Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes of Microdissected Marginal Zone (MGZ) B Cells Suggests that the MGZ of Human Spleen Is a Reservoir of Memory B Cells. *The Journal of experimental medicine*, 182: 559-566.
23. Fearon D.T., Carroll M.C. (2000): Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annual review of immunology* 18: 393-422.
24. Fecteau J.F., Genevieve C., Néron S. (2006): A new memory CD27⁺IgG⁺ B cell population in peripheral blood expressing V_H genes with low frequency of somatic mutation. *The Journal of immunology* 177: 3728-3736.
25. Garibyan L., Lobito A.A., Siegel R.M., Call M.E., Wucherpfennig K.W., Geha R.S. (2007): Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in CVID. *The Journal of clinical investigation* 117: 1550-1557.
26. Goldsby R.A., Osborne B.A., Kindt J., Kuby J. (2006): *Kuby Immunobiology*. W H Freeman & Co.
27. Gorny M.K., Wang X.H., Williams C., Volsky B., Revesz K., Witover B., Burda S., Urbanski M., Nyambi P., Krachmarov C., Pinter A., Zolla-Pazner S., Nadas A. (2009): Preferential use of the VH5-51 gene segment by the human immune response to code for antibodies against the V3 domain of HIV-1. *Molecular immunology* 46: 917-26.
28. Grimbacher B., Hutloff A., Schlesier M., Glocker E., Warnatz K., Dräger R., Eibel H., Fischer B., Schäffer A.A., Mages H.W., Kroczeck R.A., Peter H.H. (2003): Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nature Immunology* 4: 261-268.
29. Hammarström L., Vorechovsky I., Webster D. (2000): Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and experimental immunology* 120: 225-231.
30. Heltemes L.M., Manser T. (2002): Level of B cell antigen receptor surface expression influences both positive and negative selection of B cells during primary development. *Journal of immunology* 169: 1283-92.
31. Hořejší V., Bartůňková J. (2005): *Základy imunologie*, 3. vydání, Triton, Praha.

32. Hoyer B.F., Manzi R.A., Radbruch A., Hiepe F. (2005): Long-lived plasma cells and their contribution to autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1050: 124-33.
33. Hutloff A., Dittrich A.M., Beier K.C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Kroczeck R.A. (1999): ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397: 263-266.
34. Chung J.B., Sater R.A., Fields M.L., Erikson J., Monroe J.G. (2002): CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *International immunology* 14: 157-66.
35. Chung, J.B., Silverman M., Monroe J.G. (2003): Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends in Immunology* 24: 343-9.
36. Ippolito G.C., Schelonka R.L., Zemlin M., Ivanov I.I., Kobayashi R., Zemlin C., Gartland G.L., Nitschke L., Pelkonen J., Fujihashi K., Rajewsky K., Schroeder H.W. Jr (2006): Forced usage of positively charged amino acids in immunoglobulin CDR-H3 impairs B cell development and antibody production. *The Journal of experimental medicine* 203: 1567-78.
37. Ivanov I.I., Schlonka R.L., Zhuang Y., Gartland G.L., Zemlin M., Schroeder W. Jr (2005): Development of the expressed Ig CDR-H3 repertoire is marked by focusing of constraints in length, amino acid use, and charge that are first established in early B cell progenitors. *Journal of immunology* 174: 7773-80.
38. Janeway, C. (2001): *Immunobiology 5: the immune system in health and disease*. New York, Garland Pub.
39. Kay R., Rosten P.M., Humphries R.K. (1991): CD24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *The Journal of immunology* 147: 1412-1416.
40. Klein U., Küppers R., Rajewsky K. (1997): Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* 89: 1288-98.
41. Klein U., Rajewsky K., Küppers R. (1998): Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *The Journal of experimental medicine* 188: 1679-1689.

42. Kokron C.M., Errante P.R., Barros M.T., Baracho G.V., Camargo M.M., Kalil J., Rizzo, L.V. (2004): Clinical and laboratory aspects of common variable immunodeficiency. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 76: 707-726.
43. Kotnis A., Du L., Liu C., Popov S.W., Pan-Hammarström Q. (2009): Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philosophical Transactions of The Royal Society, Series B, Biological sciences* 364: 653-665.
44. Kralovicova J., Hammarström L., Plebani A., Webster A.D., Vorechovsky I. (2003): Fine-scale mapping at IGAD1 and genome-wide genetic linkage analysis implicate HLA-DQ/DR as a major susceptibility locus in selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Journal of immunology* 170: 2765-75.
45. Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *The EMBO journal* 12: 4955-4967.
46. Link J.M., Schroeder H.W. Jr (2002): Clues to the etiology of autoimmune diseases through analysis of immunoglobulin genes. *Arthritis research* 4:80-3.
47. Liu L., Lucas A.H. (2003): IGH V3-23*01 and its allele V3-23*03 differ in their capacity to form the canonical human antibody combining site specific for the capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b. *Immunogenetics* 55: 336-8.
48. Loder F., Mutschler B., Ray R.J., Paige C.J., Sideras P., Torres R., Lamers M.C., Carsetti R. (1999): B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of b cell receptor-derived signals. *The Journal of experimental medicine* 190: 75-89.
49. Lucas A.H., McLean G.R., Reason D.C., O'Connor A.P., Felton M.C., Moulton K.D. (2003): Molecular ontogeny of the human antibody repertoire to the *Haemophilus influenzae* type B polysaccharide: expression of canonical variable regions and their variants in vaccinated infants. *Clinical immunology* 108: 119 - 27.
50. Maclennan I.C.M. (1994): Germinal-centers. *Annual review of immunology* 12: 117-139.

51. Malavasi F., Funaro A., Roggero S., Horenstein A., Calosso L., Mehta K. (1994): Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today*, 15(3):95-7.
52. Martomo S.A., Gearhart P.J. (2006): Somatic hypermutation:subverted DNA repair. *Current Opinion in Immunology* 18: 243-248.
53. Medina F., Segundo C., Campos-Caro A., González-García I., Brieva J.A. (2002): The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 99: 2154-2161.
54. Merrell K.T., Benschop R.J., Gauld S.B., Aviszus K., Decote-Ricardo D., Wysocki L.J., Cambier J.C. (2006): Identification of Anergic B Cells within a Wild-Type Repertoire. *Immunity* 25: 953-962.
55. Morutza Y.F., Moreira I.M., Papaioannou M., Gameiro P., Coyle L.A., Gricks C.S., Amlot P., Prentice H.G., Madrigal A., Hoffbrand A.V., Foroni L. (2001): Immunoglobulin heavy-chain gene rearrangement in adult acute lymphoblastic leukemia reveals preferential usage of J(H)-proximal variable gene segments. *Blood* 97: 2716-2726.
56. Müller-Hermelink H.K., Greiner A. (1998): Molecular analysis of human immunoglobulin heavy chain variable genes (IgVH) in normal and malignant B cells. *The American journal of pathology* 153:1609-14.
57. Nagaoka H., Muramatsu M., Yamamura N., Kinoshita K., Honjo T. (2002): Activation-induced deaminase (AID)-directed hypermutation in the immunoglobulin S μ region: implication of AID involvement in common step of class switch recombination and somatic hypermutation. *The Journal of experimental medicine* 195: 529-534.
58. Neuberger M.S., Rada C. (2006): Somatic hypermutation: activation-induced deaminase for C/G followed by polymerase η for A/T. *The Journal of experimental medicine* 204: 7-10.
59. Pan-Hammarström Q., Zhao Y., Hammarström L. (2007): Class switch recombination: a comparison between mouse and human. *Advances in immunology* 93:1-61.
60. Paramithiotis E., Cooper M.D. (1997): Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 208-212.

61. Piqueras B., Lavenu-Bombled C., Galicier L., Cruyssen F.B.-V.D., Mouthon L., Chevret S., Debré P., Schmitt C., Oksenhendler E. (2003): Common Variable Immunodeficiency Patient Classification Based on Impaired B Cell Memory Differentiation Correlates with Clinical Aspects. *Journal of clinical immunology* 23: 385-400.
62. Rosner K., Winter D.B., Tarone R.E., Skovgaard G.L., Bohr V.A., Gearhart P. (2001): Third complementarity-determining region of mutated VH immunoglobulin genes contains shorter V, D, J, P and N components than non-mutated genes. *Immunology* 103: 179-187.
63. Ruzickova S., Pruss A., Odendahl M., Wolbart K., Burmester G.R., Scholze J., Dörner T., Hansen A. (2002): Chronic lymphocytic leukemia preceded by cold agglutinin disease: intraclonal immunoglobulin light-chain diversity in V(H)4-34 expressing single leukemic B cells. *Blood* 100: 3419-22.
64. Salzer U., Chapel H.M., Webster A.D., Pan-Hammarström Q., Schmitt-Graeff A., Schlesier M., Peter H.H., Rockstroh J.K., Schneider P., Schäffer A.A., Hammarström L., Grimbacher B. (2005): Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nature Genetics* 37:820-828.
65. Sato S., Steeber D.A., Tedder T.F. (1995): The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 11558-11562.
66. Seki M., Gearhart P.J., Wood R.D. (2005): DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *The EMBO journal* 6: 1143-1148.
67. Shubinsky G., Schlesinger M. (1997): The CD38 lymphocyte differentiation marker: new insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. *Immunity* 7: 315-24.
68. Schelonka R.L., Ivanov I.I., Jung D.H., Ippolito G.C., Nitschke L., Zhuang Y., Gartland G.L., Pelkonen J., Alt F.W., Rajewsky K., Schroeder H.W. Jr (2005): A single DH gene segment creates its own unique CDR-H3 repertoire and is sufficient for B cell development and immune function. *Journal of Immunology* 175: 6624-6632.
69. Schneider P. (2005): The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Current Opinion in Immunology* 17: 282-289.

70. Schereen F.A., Nagasawa M., Weijer K., Cupedo T., Kirberg J., Legrand N., Spits H. (2008): T-cell independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells. *The Journal of experimental medicine* 205: 2033-2042.
71. Schroeder H.W. Jr (2000): Genetics of IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clinical reviews in allergy and immunology* 19: 127-40.
72. Schroeder H.W. Jr, Kirkham, PM (2000): Marriage, divorce and promiscuity in human B cells. *Nature* 1: 187-188.
73. Stavnezer J., Guikema J.E., Schrader C.E. (2008): Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual Review of Immunology* 26: 261-292.
74. Stewart A.K., Huang C., Long A.A., Stollar B.D., Schwartz R.S. (1992): VH-gene representation in autoantibodies reflects the normal human B-cell repertoire. *Immunological reviews* 128: 101-22.
75. Sun Y., Park M.K., Kim J., Diamond B., Solomon A., Nahm M.H. (1999): Repertoire of human antibodies against the polysaccharide capsule of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B. *Infection and immunity* 67: 1172-9.
76. Suzuki T., Kiyokawa N., Taguchi T., Sekino T., Katagiri Y.U., Fujimoto J. (2001): CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system. *The Journal of immunology* 166: 5567-5577.
77. Thampakkul S., Ballow M. (2001): Replacement intravenous immune serum globulin therapy in patients with antibody immune deficiency. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 21: 165-184.
78. Tian C., Luskin G.K., Dischert K.M., Higginbotham J.N., Shepherd B.E., Crowe J.E. Jr (2007): Evidence for preferential Ig gene usage and differential TdT and exonuclease activities in human naïve and memory B cells. *Molecular immunology* 44: 2173-83.
79. Tsuiji M., Yurasov S., Velinzon K., Thomas S., Nussenzweig M.C., Wardemann H. (2006): A checkpoint for autoreactivity in human IgM⁺ memory B cell development. *The Journal of experimental medicine* 203:393-400.
80. van Zelm M.C., Reisli I., van der Burg M., Castaño D., van Noesel C.J.M., van Tol M.J.D., Woellner C., Grimbacher B., Patiño P.J., van Dongen J.J.M., Franco J.L. (2006): An Antibody-Deficiency Syndrome Due to Mutations in the CD19 Gene. *New England Journal of Medicine* 354: 1901-1912.

81. Vlková M. (2008): Flowcytometrická analýza T a B lymfocytárních subpopulací u pacientů s humorálními imunodeficiencemi. Doktorská dizertační práce, Masarykova Univerzita v Brně, lékařská fakulta.
82. von Andrian U.H., Mempel T.R. (2003): Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature reviews. Immunology* 3: 867-878.
83. Wardemann H., Yurasov S., Schaefer A., Young J.W., Meffre E., Nussenzweig M.C. (2003): Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301:1374-7.
84. Warnatz K., Denz A., Dräger R., Braun M., Groth C., Wolff-Vorbeck G., Eibel H., Schlesier M., Peter H.H. (2002): Severe deficiency of switched memory B cells (CD27⁺IgM⁻IgD⁻) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 99: 1544-1551.
85. Warnatz K., Schleiser M. (2008): Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Clinical Cytometry* 74: 261-271.
86. Wehr C., Kivioja T., Schimtt C., Ferry B., Witte T., Eren E., Vlkova M., Hernandez M., Detkova D., Bos P.R., Poerksen G., von Bernuth H., Bauman U., Goldacker S., Gutenberger S., Schlesier M., van der Cuyse F.B., Le Garff M., Debré P., Jacobs R., Jones J., Bateman E., Litzman J., van Hagen P.M., Plebani A., Schmidt R.E., Thon V., Quinti I., Espanol T., Webster A.D., Chapel H., Vihinen M., Oksenhendler E., Peter H.H., Warnatz K. (2007): The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 111:77-85.
87. Weitkamp J.H., Kallewaard N., Kusuhara K., Bures E., Williams J.V., LaFleur B., Greenberg H.B., Crowe J.E. Jr (2003): Infant and adult human B cell responses to rotavirus share common immunodominant variable gene repertoires. *Journal of immunology* 171: 4680-8.
88. Weller S., Braun M.C., Tan B.K., Rosenwald A., Cordier C., Conley M.E., Plebani A., Kumararatne D.S., Bonnet D., Toumilhac O., Tchemia G., Steinger B., Staudt L.M., Casanova J.-L., Reynaud C.-A., Weill J.-C. (2004): Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104: 3647-3654.
89. Weller S., Mamani-Matsuda M., Picard C., Cordier C., Lecoecuche D., Gauthier F., Weill J.-C., Reynaud, C.-A. (2008): Somatic diversification in the absence of

- antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+IgD+CD27+ B cell repertoire in infants. *The Journal of experimental medicine* 205: 1331-1342.
90. Wilson T.M., Vaisman A., Martomo S.A., Sullivan P., Lan L., Hanaoka F., Yasui A., Woodgate R., Gearhart P.J. (2005): MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase ϵ , suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *The Journal of experimental medicine* 201:493-496.
91. Wlodarska I., Matthews C., Veyt E., Pospisilova H., Catherwood M.A., Poulsen T.S., Vanhentenrijk V., Ibbotson R., Vandenberghe P., Morris T.C., Alexander H.D. (2007): Telomeric IGH losses detectable by fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia reflect somatic VH recombination events. *The Journal of molecular diagnostics* 9: 47-54.

9 Seznam zkratek

A	adenin, adenine
AID	aktivací indukovaná cytidin deamináza, activation-induced cytidin deaminase
AMK	aminokyselina
APC	allofykocyanin, allophycocyanine
APRIL	proliferaci indukující ligand, a proliferation-inducing ligand
AV ČR	Akademie věd České Republiky
BAFF	B buněčný aktivační faktor, B cell activating factor
BCR	receptor B lymfocytu, B cell receptor
BSA	bovinní serový albumin, bovine serum albumin
C	konstantní úsek genového komplexu imunoglobulinu, constant region of gene complex of immunoglobulin; cytosin, cytosine
CAML	ligand regulující vápník, calcium-modulating ligand
CD	cluster of diferentiation
CD40L	CD40 ligand
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina, complementary deoxyribonucleic acid
CDR	oblast určující komplementaritu, complementarity determing region
CDR-H1	první CDR oblast těžkého řetězce, the first complementarity determing region of heavy chain
CDR-H2	druhá CDR oblast těžkého řetězce, the second complementarity determing region of heavy chain
CDR-H3	třetí CDR oblast těžkého řetězce, the third complementarity determing region of heavy chain
CDR-L1	první CDR oblast lehkého řetězce, the first complementarity determing region of ligt chain
CDR-L2	druhá CDR oblast lehkého řetězce, the second complementarity determing region of ligt chain
CDR-L3	třetí CDR oblast lehkého řetězce, the third complementarity determing region of ligt chain
C _L	konstantní část lehkého řetězce protilátky, constant region of light chain
CVID	běžný variabilní imunodeficit, common variable immunodeficiency

D	„diversity“ úsek genového komplexu imunoglobulinu, diversity region of gene complex of immunoglobulin
D _H	„diversity“ úsek genového komplexu těžkého řetězce imunoglobulinu, diversity region of gene complex of heavy chain of immunoglobulin
Da	dalton, jednotka relativní molekulové hmotnosti
DNA	kyselina deoxyribonukleová, deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát, deoxynucleotidetriphosphate
dT	deoxythimidin, deoxythimidine
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ESID	Evropská společnost pro imunodeficienci, European Society for Immunodeficiencies
FACS	průtokový cytometr se sortovacím modulem, fluorescence-activated cell sorter
FDC	folikulární dendritická buňka, follicular dendritic cell
FITC	fluoresceinizothioxyanát, fluoresceinisoithiocyanate
FN	fakultní nemocnice
FR	framework region
FSC	forward scatter
G	guanin, guanine
HLA	lidský leukocytární antigen, human leukocyte antigen
C _H	konstantní část těžkého řetězce protilátky, constant region of heavy chain
ICOS	indukovatelná kostimulační molekula, inducible costimulator molecule
ID	imunodeficienci, immunodeficiency
Ig	imunoglobulin, immunoglobulin
IGA MZ ČR	Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví České Republiky
IgAD	IgA deficienci, IgA deficiency
IL	interleukin, interleukine
IS	imunitní systém, immune system
IVIG	intravenózní imunoglobuliny, intravenous immunoglobulins
J	„joining“ úsek genového komplexu imunoglobulinu, joining region of gene complex of immunoglobulin

J _H	„joining“ úsek genového komplexu těžkého řetězce imunoglobulinu, joining region of gene complex of heavy chain of immunoglobulin
MB	paměťová B buňka, memory B cell
mf	mutační frekvence, mutational frequency
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina, messenger ribonucleid acid
MZ	marginální zóna, marginal zone
nd	nedefinované, not defined
MSH2-MSH6	MutS homologní proteiny, MutS homolog proteins
P	palindromický, palindromic
PBMC	mononukleární buňky periferní krve, peripheral blood mononuclear cells
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok, phosphate buffered saline
PC	fykoerytrin-cyanin, phycoerythrine-cynine
PCR	polymerázová řetězová reakce, polymerase chain reaction
PE	fykoerytrin, phycoerithrine
pre-B	prekurzorový B lymfocyt, precursor B lymphocyte
pro-B	progenitorový B lymfocyt, progenitor B lymphocyte
RA	revmatoidní artritida, rheumatoid arthritis
RAG	rekombinaci aktivující gen, recombination activating gene,
RSS	rekombinační signální sekvence, recombination signal sequence
RT	room temperature, pokojová teplota
RT-PCR	reverzně transkriptázová PCR, reverse transcriptase PCR
S	switch sekvence, switch sequence
SCIG	podkožní imunoglobuliny, subcutaneus immunoglobulins
sd	standardní odchylka, standard deviation
SHM	somatická hypermutace, somatic hypermutation
SLB	Sigma loading buffer
SLE	systémový lupus erythematosus, systemic lupus erythematosus
smB	izotypově přepnutá paměťová buňka, switched memory B cell
SSC	side scatter
ssDNA	jednovláknová DNA, single-strand DNA
T	thymin, thymine
T1, T2, T3	transientní buňky, transient cells
TACI	transmembránový aktivátor interagující s CAML, transmembrane activator and CAML interactor

TBE	tris-borátový pufr s EDTA, tris-borate buffer with EDTA
TdT	terminální deoxynukleotidyl transferáza, terminal deoxynucleotidyl transferase
Th1	pomocné T lymfocyty, helper T lymphocytes
TI	T-nezávislý, T-independent
TNF	faktor nekrotizující nádory, tumor necrosis factor
Tr	transientní, transient
U	uracil, uracile
V	„variability“úsek genového komplexu imunoglobulinu, variability region of gene complex of immunoglobulin
V _H	variabilní část těžkého řetězce protilátky, variable region of heavy chain; variability“úsek genového komplexu těžkého řetězce imunoglobulinu, variability region of gene complex of heavy chain of immunoglobulin
V _L	variabilní část lehkého řetězce protilátky, variable region of light chain
WSB	promývací a značící pufr, wash and staining buffer