

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY
KARLOVY V PRAZE**

Biologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Subpopulace B a T lymfocytů při imunodeficitních stavech



Vendula Šinkorová

Školitel: Doc. MUDr. Tomáš Kalina, Ph.D.

Praha 2012

Svému školiteli Doc. MUDr. Tomášovi Kalinovi Ph.D. děkuji za cenné rady, trpělivost a pomoc při zpracování této práce.

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

V Praze, 9.5.2012

Osnova

1	Abstrakt	4
2	Abstract	5
3	Zkratky	6
4	Úvod	8
5	Hematopoéza	9
6	Vrozená imunita a její interakce se specifickými mechanizmy	9
7	Specifická imunita	10
7.1	Diferenciace a funkce T lymfocytů	11
7.1.1	β-selekce	12
7.1.2	Pozitivní selekce	13
7.1.3	Negativní selekce	13
7.1.4	Fenotyp a funkce jednotlivých subpopulací	13
7.2	Diferenciace a funkce B lymfocytů	16
7.2.1	Vývoj B lymfocytů	16
7.2.2	T-závislá B lymfocytární odpověď	17
7.2.3	T-nezávislá B lymfocytární odpověď	18
7.3	Paměťové buňky imunity	19
8	Imunodeficiency	22
8.1	Těžký kombinovaný imunodeficit (SCID)	22
8.1.1	Defekty V(D)J rekombinace	22
8.1.2	NHEJ deficit	23
8.1.3	Deficitní cytokinová signalizace	24
8.2	Imunodeficiency protilátkové	25
8.2.1	Agamaglobulinémie vázaná na X chromozom (XLA)	26
8.2.2	CVID (Common Variable Immunodeficiency)	26
8.2.3	Přechodná dětská hypogamaglobulinémie	27

8.2.4	Selektivní IgA imunodeficit	27
8.3	Funkční poruchy T lymfocytů	27
8.3.1	Syndrom holých lymfocytů (BLS, Bare Lymphocyte Syndrom)	27
8.3.2	Hyper IgM syndrom	28
8.3.3	Lymfoproliferativní X-vázaný syndrom	29
9	Závěr.....	30
10	Použitá literatura	31

1 Abstrakt

B a T lymfocyty tvoří antigenně specifickou část imunitního systému. Spolu s buňkami nespecifické imunity začínají svůj vývoj ve fetálních játrech a později v kostní dřeni ze společného progenitoru, tzv. hematopoetické kmenové buňky. Obě hlavní větve krvetvorby dále procházejí diferenciačními procesy regulovanými mnoha cytokiny a transkripčními faktory, vedoucími k velmi heterogenní skupině subpopulací. Protože imunitní systém slouží k obraně těla nejen před vnějšími vlivy a nádorovým bujením, ale také před sebou samým, je diferenciace lymfocytů podmíněna mnoha kontrolními body, při kterých jsou klony B a T lymfocytů přísně selektovány. Obě hlavní lymfocytární linie spolu navzájem i s buňkami nespecifické imunity úzce spolupracují a komunikují. Pokud dojde k narušení diferenciace nebo efektorové funkce v důsledku mutace genů, kódujících proteiny zajišťující některé z těchto funkcí, nastává stav zvaný primární imunodeficit. Velmi vhodnou metodou pro studium lymfocytárních subpopulací a jejich imunodeficitů je multiparametrická imunofenotypizace a její detekce technikou průtokové cytometrie. Na vybraných příkladech primárních lidských imunodeficitů B a T lymfocytů je v této práci ukázáno, jaký mají dopad na jednotlivé subpopulace lymfocytů, co z toho vyplývá pro zdraví organismu a proč je nutné imunodeficity studovat.

Klíčová slova: hematopoéza, T lymfocyt, B lymfocyt, specifická imunita, primární imunodeficit (ID), SCID, humorální ID, T lymfocytární ID

2 Abstract

The antigen-specific immunity consists of cells called T and B lymphocytes. These cells together with cells of non-specific (innate) immunity begin their development in fetal liver and later in bone marrow from the common progenitor, the hematopoietic stem cell. Both B and T lymphocyte lineages then undergo differentiation which is regulated by many cytokines and transcriptional factors and leads to very heterogeneous cohort of subsets. Because the immune system is not only protecting the organism from infections and malignant growth but also from itself, lymphocyte differentiation must pass many checkpoints where B and T clones are strictly selected. Cells of both lineages closely communicate with each other and also with cells of innate immunity. If, due to mutation of protein encoding genes, disturbance of differentiation or malfunction of effector activities providing some of these functions occurs, an immune system malfunction called immunodeficiency arises. Multiparametric immunophenotyping followed by flow cytometry examination has been proven one of the most suitable techniques for studying lymphocyte subsets and lymphocyte-associated immunodeficiencies. Here we describe examples of primary lymphocyte-associated immunodeficiencies, how they affect individual lymphocyte subsets, what it means for the health status of the organism and why it is important to study them.

Keywords: hematopoiesis, B lymphocyte, T lymphocyte, specific immunity, primary immunodeficiency (ID), SCID, humoral ID, T lymphocyte ID

3 Zkratky

AID	aktivací indukovaná cytidin deamináza (antigen-induced cytidin deaminase)
AK	adenylát kináza
APC	buňka prezentující antigen (antigen-presenting cell)
BCR	receptor B lymfocytů pro antigen (B-cell receptor)
Btk	Brutonova tyrosin kináza
CD	diferenční skupina (Cluster of differentiation)
CLP	společný lymfoidní progenitor (Common lymphoid progenitor)
CSR	izotypový přesmyk (class switch recombination)
CVID	běžný variabilní imunodeficit (common variable immunodeficiency)
DN	dvojitá negativita
DNA-PK	DNA protein kináza
DP	dvojitá pozitivita
EBV	virus Epstein-Barrové (Epstein-Barr virus)
FDC	folikulární dendritické buňky (follicular dendritic cells)
FO B	folikulární B lymfocyty
GC	germinální centrum
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte colony-stimulating factor)
HLA	hlavní lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
HSC	hematopoetická kmenová buňka (hematopoietic stem cell)
ICOS	inducible T-cell costimulator
IFN- γ	interferon- γ
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
LPS	lipopolysacharid
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MZ B	B lymfocyty marginální zóny
NHEJ	nehomologní spojování konců (nonhomologous end-joining)
NK	přirozený zabíječ (nature killer)
OS	Ommenův syndrom
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (patogen-associated molecular pattern)
RAG	gen aktivující rekombinaci

RD	retikulární dysgeneze
SCF	faktor kmenových buněk (stem-cell factor)
SCID	těžký kombinovaný imunodeficit (severe combined immunodeficiency)
SHM	somatická hypermutace
SP	jednoduchá pozitivita (single positivity)
T _{CM}	T lymfocyt centrální paměti (central memory T-cell)
TCR	receptor T lymfocytů pro antigen (T-cell receptor)
TD	thymově závislý (thymus-dependent)
T _{EM}	efektorový paměťový T lymfocyt (effector memory T-cell)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
T _H	pomocný T lymfocyt (T-helper cell)
TI	thymově nezávislý (thymus-independent)
TNF	faktor nekrotizující tumory (tumor necrosis factor)
T _{REG}	regulační T lymfocyt (regulatory T-cell)
XLA	X-vázaná agamaglobulinemie (X-linked agammaglobulinemia)
XLP	lymfoproliferativní syndrom vázaný na chromozom X (X-linked lymphoproliferative disorder)

4 Úvod

Imunitní systém patří mezi regulační systémy těla. Zajistišťuje komplexní ochranu organismu před patogeny a toxickými látkami, rozpoznává a odstraňuje buňky staré, poškozené nebo mutované a zároveň musí své aktivity regulovat tak, aby nepoškodzovaly hostitelský organismus, musí tedy být tolerantním vůči buňkám tělu vlastním.

Ze společného progenitoru, hematopoetických kmenových buněk, se vyvíjejí dvě buněčné linie krvetvorby – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie se vyvíjejí erytrocyty, krevní destičky a buňky nespecifické imunity, jako jsou granulocyty a monocyty. Lymfoidní linie dává kromě NK buněk vzniknout B a T lymfocytům zajišťujícím získanou imunitu. Obě tyto linie procházejí velmi složitou diferenciací vedoucí k finálním efektorovým a paměťovým buňkám. Na této diferenciační cestě spolupracují spolu navzájem a také s druhou složkou imunitního systému, s imunitou vrozenou.

Získaná imunita má velmi důležitou vlastnost imunitní paměti. Je to schopnost uchovávat si dlouhodobě buňky specifické pro antigen, se kterým se už organismus v minulosti setkal a při opětovném setkání s tímto antigenem na něj reagovat rychleji a mnohem účinněji.

Obě linie lymfocytů jsou morfologicky podobné, jsou to mononukleární buňky s malým množstvím cytoplasmy, ale velmi se liší svými funkcemi a povrchovými molekulami. Obě linie jsou také tvořeny heterogenními subpopulacemi rozlišitelnými funkčně i fenotypově. V určování těchto subpopulací se ukázala být velmi účinná technologie průtokové cytometrie, která umožňuje multiparametrickou fluorescenční detekci různých markerů na povrchu lymfocytů.

V případě, že je fatálně mutován některý z genů kódujících proteiny důležité pro vývoj nebo funkci lymfocytů, nastává stav zvaný imunodeficit, při kterém imunitní systém není zcela funkční. Organismus je pak méně odolný vůči patogenům a toxinům, bývá vystaven autoimunitním potížím a některé imunodeficity se projevují nádorovým bujením. Díky výzkumu primárních imunodeficitů byly přiřazeny funkce mnoha genům a proteinům účastnících se imunitních reakcí a byly objeveny diferenciační cesty lymfocytů, efektorové funkce a vzájemné interakce těchto buněk.

Účelem této práce je popsat vývoj a funkce jednotlivých lymfocytárních subpopulací a poukázat na to, jaké složení má lymfoidní kompartment, příp. jaký imunofenotyp je typicky nalézán při některých vybraných imunodeficitech B a T lymfocytů, jak ovlivní deficit jedné subpopulace vývoj jiné, co z toho vyplývá pro organismus a jaké jsou možnosti terapie.

5 Hematopoéza

Hematopoéza, tedy krvetvorba, je děj, kdy se z hematopoetických kmenových buněk (HSC) v kostní dřeni diferencují erytrocyty, leukocyty a krevní destičky. Probíhá v játrech plodu a ke konci embryonálního vývoje přechází do kostní dřeně. Dřeň je tvořena vaskulární sítí z tenkostěnných a fenestrovaných sinusoidních kapilár, obklopených HSC (Kopp et al. 2005). Je to důmyslný systém, který zajišťuje snadnou a efektivní regulaci krvetvorby signalizací buňka – buňka nebo pomocí různých regulačních molekul, jako jsou hormony, cytokiny a transkripční faktory (Murre 2009). Úkolem tohoto systému v kostní dřeni je udržovat konstantní počty buněk imunitního systému v periferní krvi.

HSC jsou multipotentní buňky, které se dělí a dávají tak vzniknout dalším HSC, které se dále množí nebo se diferencují na progenitorové buňky dvou linií – myeloidní a lymfoidní. Pokud progenitorová buňka dostane patřičný signál, diferencuje se na buňku prekurzorovou.

6 Vrozená imunita a její interakce se specifickými mechanismy

Vrozená imunita (antigenně nespecifická, přirozená) je evolučně starší, nacházíme ji v různé formě u všech mnohobuněčných organismů. Je neadaptivní, nefunguje na základě rozpoznání antigenu, ale reaguje na fylogeneticky konzervované struktury patogenů, tzv. PAMP (pathogen-associated molecular pattern). Veškeré mechanismy vrozené imunity jsou pevně zakódovány v DNA organismu a jsou, pokud pomineme evoluci, neměnné.

Organismům, kterým se vyvinula i imunita antigenně specifická, se vrozená imunita zachovala a obě tyto složky se nadále vyvíjely paralelně, což je dovedlo k úzké spolupráci. V další části proto krátce popíšeme interakce mezi těmito dvěma imunitními mechanismy.

Stejně jako získaná je imunita vrozená tvořena dvěma složkami – buněčnou a humorální. Buněčné složky jsou odvozené z lymfoidní linie (NK buňky), ale hlavně z myeloidní linie, tedy monocyty, polymorfonukleární granulocyty (neutrofil, eosinofil a bazofil) a trombocyty. Humorální složkou jsou komplement, proteiny akutní fáze a interferony. I tkáň, fungující jako bariéry – kůže a sliznice – patří do nespecifické imunity organismu.

Protilátky produkované B lymfocyty opsonizují patogeny pro fagocyty a jsou jedním ze způsobů aktivace komplementu. B a T lymfocyty také produkují cytokiny, na které odpovídají bazofily a eozinofily.

Buňky, které se diferencují z monocytů – dendritické buňky a makrofágy – se řadí do skupiny APC (antigen presenting cell). Oba tyto buněčné typy jsou tvořeny heterogenními

populacemi v závislosti na tom, ve které tkáni účinkují. APC exprimují na svém povrchu kromě MHC (major histocompatibility complex) glykoproteinů I. třídy také MHC II. třídy, také nazývané HLA II (human leukocyte antigen). Jsou to transmembránové heterodimery sestávající z α a β řetězce. HLA II molekuly umožňují APC vystavovat na svém povrchu peptidové antigeny, získané z fagocytovaných částic. Jejich funkcí je aktivovat CD4+ lymfocyty a tím iniciovat specifickou imunitní odpověď (Cresswell 1994) a dále jsou nutné k jejich negativní a pozitivní selekci v thymu (Janeway 1994), aktivují B lymfocyty (Scholl and Geha 1994) a účastní se při aktivaci T lymfocytů superantigenem (Herman et al. 1991).

MHC I. třídy (HLA I) jsou tvořeny jedním α řetězcem sestávajícím ze tří domén invariálních β 2-mikroglobulinem. Stejně jako HLA II jsou to transmembránové proteiny, ale prezentují peptidy syntetizované v buňce mimo kompartmenty spojené s fagocytózou CD8+ T lymfocytům. Na rozdíl od HLA II molekul jsou exprimovány na všech jaderných buňkách organismu. Imunita spojená s kontrolou antigenního spektra na HLA I glykoproteinech tedy slouží v obraně proti virům a mutacím způsobujícím nádorové bujení.

7 Specifická imunita

Specifická imunita je částečně vrozená, protože vzniká na základě rekombinace genových segmentů kódujících antigenní receptory, a částečně získaná, protože se formuje až po setkání s antigenem. Má paměť, což zajišťuje organismu sekundární odpověď na infekci, která je rychlejší a účinnější. Dá se říci, že v průběhu života organismu podstupuje neustálou evoluci tím, že genové segmenty kódující variabilní domény receptorů jejich buněk podléhají změnám, které způsobují, že vzniká mnoho odlišných antigenních specifit. Buněčnými složkami získané imunity jsou T a B lymfocyty. B lymfocyty sekretují protilátky (imunoglobuliny, Ig), které tvoří složku humorální.

Existují tři diferenciační cesty, kterými se mohou buňky lymfoidní linie ubírat, a to směrem k T lymfocytu, B lymfocytu nebo NK buňce. Tyto linie se diferencují na další subpopulace s různými funkcemi. Díky objevu monoklonálních protilátek je každý z těchto buněčných typů odlišitelný pomocí antigenních receptorů a dalších povrchových molekul nazývaných také markery. Kromě alternativních názvů jsou označovány i písmeny CD (Cluster of Differentiation) s přiděleným číslem. Číslování CD probíhalo podle pořadí objevení a následné charakterizace dané molekuly a zatím bylo popsáno více než 320 unikátních CD. Každá fáze vývoje lymfocytů a každá subpopulace exprimuje soubor pro ni

specifických markerů, čehož se využívá při multiparametrické imunofenotypizaci a vícebarevné analýze na průtokovém cytometru.

Průtokový cytometr měří vlastnosti jednotlivých buněk a jejich počet tak, že je jednotlivě vystavuje paprsku monochromatického (laserového) záření. Moderní cytometry používají několika různých laserů. Pomocí detektorů sbírá rozptýlené světlo a světlo emitované fluorochromy, kterými jsou monoklonální protilátky označeny. Protože každá monoklonální protilátka má svou specifickou barvu danou excitační vlnovou délkou a emisním spektrem, umožňuje analýza barevnosti jednotlivých buněk jejich klasifikaci na základě výskytu povrchových a/nebo vnitrobuněčných znaků.

7.1 Diferenciace a funkce T lymfocytů

Mechanismy určující, kterým směrem se bude společný lymfoidní prekurzor (CLP, common lymphoid progenitor) diferencovat, nejsou ještě plně objasněny. Kromě jiných faktorů zde hraje roli konzervovaný transmembránový protein Notch1 a jeho ligandy Delta a Jagged. Signalizace přes tento receptor zřejmě ovlivňuje lymfocytární diferenciaci ve třech kontrolních bodech; volba B nebo T buněčné linie, divergence $\gamma\delta$ a $\alpha\beta$ TCR+ (T – cell receptor) T buněk a příslušnost k CD4+ nebo CD8+ subpopulaci. Exprese Notch1 rozhoduje při diferenciaci prekurzoru ve prospěch T lymfocytu na úkor B lymfocytu, jak dokazují dva rozdílné experimenty. U myši, kterým byla transplantována kostní dřev s pomocí retroviru transdukovaných buněk tak, aby kontinuálně produkovaly Notch1, docházelo k vývoji CD4+CD8+ T lymfocytů ektopicky v kostní dřevě a vývoj B lymfocytů byl potlačen (Pui et al. 1999). Naopak u myši, kterým byla indukována ztráta schopnosti exprimovat Notch1 byla nalezena, kromě jiných dopadů na organismus, blokáde vývoje thymocytů (T lymfocyt zrající v thymu) ve velmi rané fázi (Radtke et al. 1999).

Část lymfoidních prekurzorů, která z kostní dřevě vycestuje do thymu, zde dává vzniknout T lymfocytům. V těchto tzv. prothymocytech se začínají formovat antigenně specifické receptory pomocí procesu V(D)J rekombinace. Genové segmenty V (Variable), D (Diversity) a J (Joining) variabilních domén jsou přeskupovány tak, že vzniká nepřeberné množství různých kombinací, pokrývajících obrovskou škálu peptidových antigenů, se kterými se organismus může setkat.

Progenitorové buňky T lymfocytů jsou dvojitě negativní (DN), protože nenesou povrchové kostimulační molekuly CD4 a CD8. V myším thymu rozeznáváme čtyři typy DN buněk podle exprese receptoru pro SCF (stem cell factor, CD117) a alfa řetězce receptoru pro interleukin-2 (IL-2R, CD25). Exprese těchto receptorů vypovídá o tom, v jaké fázi V(D)J

rekombinace se TCR prothymocyt nachází. Při zvýšení exprese CD25 doprovázené sníženou povrchovou hustotou CD117 dochází současně k rekombinaci V(D)J segmentů v genech pro β , γ a δ řetězce TCR.

Prekurozory T lymfocytů mohou dát vzniku dvěma typům lymfocytů v závislosti na tom, jaký typ TCR exprimují. Mohou to být buď $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$ T lymfocyty. Není zcela známo, jaké faktory rozhodují o $\alpha\beta$ nebo $\gamma\delta$ osudu, nejčastější hypotézou je však to, že receptor je zvolen podle toho, který typ se úspěšně rekombinuje a tento receptor poté signalizuje inhibici rekombinace genů pro druhý typ (Gerber, Boucontet, and Pereira 2004).

Druhou, TCR nezávislou hypotézou, je funkce Notch1 receptoru, kterou by podpořily analýzy Notch1 deletovaných myší (Washburn et al. 1997).

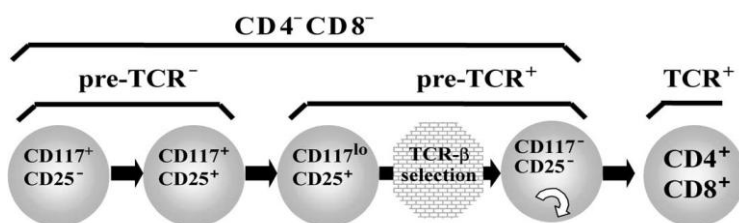
Prothymocyt s markery CD117-CD25+ již exprimuje na svém povrchu pre-TCR komplex (TCR β + preT α + CD3 komplex) a podstupuje β -selekcí.

7.1.1 β -selekcce

β -selekcce je kontrola, zda prothymocyty exprimují pre-TCR komplex s úspěšně rekombinovanými V(D)J genovými úseky B řetězce. Pokud ano, jsou tyto buňky chráněny před apoptózou, dostávají signál k proliferaci, ke zvýšení exprese CD4 a CD8 molekul na svém povrchu a zároveň ke snížení výskytu CD25. Tyto signály jsou vedeny přes pre-TCR. Vzniklé dvojité-pozitivní (DP) thymocyty signalizací přes vystavené pre-TCR blokují další rekombinaci v β -lokusu na všech alelách, což je proces nazývaný alelická exkluze. V této fázi se také iniciuje rekombinace genů pro TCR α řetězce.

DP thymocyt dále musí projít dvěma dalšími kontrolami – negativní a pozitivní selekcí. Tyto dva procesy vyřazují thymocyty, které jsou buď autoreaktivní nebo neschopné dostatečně silně rozeznat komplex MHC molekuly a antigenového peptidu.

Obrázek č. 1



Ranný vývoj T lymfocytů (převzato z Michie and Zúñiga-Pflücker 2002).

7.1.2 Pozitivní selekce

Pozitivní selekce probíhá v korové oblasti thymu, kde epiteliální buňky a APC vystavují thymocytům antigeny v komplexu s MHC glykoproteiny. Přežívají pouze thymocyty, které MHC glykoproteiny rozeznávají s nízkou afinitou. V této fázi také probíhá výběr, zda budoucí buňka s jednoduchou pozitivitou (SP, single positive) bude exprimovat CD4 nebo CD8 molekulu, a to podle toho, se kterou třídou MHC molekul buňka interaguje (von Boehmer 1994). Rekombinace lokusu TCR α probíhá dokud TCR nerozezná MHC molekulu i navázaný antigen (MHC restrikce) a teprve potom je signalizováno snížení exprese *RAG* (recombination activating genes) genů, které se účastní V(D)J rekombinace a diferenciace pokračuje (Monroe et al. 2003).

Budoucí CD4+ buňky rozeznávají MHC II a budoucí CD8+ buňky rozeznávají MHC I třídy. Jednoduchá pozitivita (CD4+CD8- nebo CD4-CD8+) je zajišťována snížením výskytu jednoho z těchto receptorů. Toto je třetí kontrolní bod, jímž T lymfocyty při vývoji procházejí a kde studie na transgenních myších (Fowlkes and Robey 2002) naznačují, že exprese Notch1 reguluje diferenciaci DP buněk směrem k CD4-CD8+ linii.

7.1.3 Negativní selekce

Negativní selekci podstupují SP T lymfocyty. Pomocí interakce TCR s MHC I na APC a thymových epiteliálních buňkách jsou jim vystavovány peptidové antigeny endogenního původu. Pokud SP thymocyt vykazuje příliš velkou afinitu k těmto antigenům vlastním organismu, dostává signál k apoptóze. Toto však neplatí pro všechny SP thymocyty, část jich je ušetřena a diferencuje se na regulační (T_{REG}) lymfocyty. Buňky, které úspěšně projdou všemi třemi kontrolami, opouštějí thymus jako naivní T lymfocyty. To je asi 5 % z původního počtu.

7.1.4 Fenotyp a funkce jednotlivých subpopulací

7.1.4.1 Cytotoxické T lymfocyty

Naivní CD8+ (cytotoxické, T_C) T lymfocyty na tzv. periférii, což je krev, lymfa, lymfatické tkáně a sekundární lymfatické orgány, čekají na aktivaci antigenem, který rozpoznají s vysokou afinitou. Pokud se tak stane, začnou rychle proliferovat. CD8+ buňky (pomocí svých TCR a jejich koreceptorů) kontrolují peptidy vystavované na MHC I buněk organismu a ničí cílové buňky v případě, že vykazují nějakou abnormalitu, což se děje, pokud je buňka napadena intracelulárním parazitem (prezentuje cizorodé peptidy, které jsou v ní syntetizovány) nebo pokud se z ní stává buňka nádorová narušením buněčného cyklu a začne

tak produkovat abnormální proteiny. T buňka kontroluje jak kvalitu, tak i kvantitu exprese MHC I molekul.

Po rozpoznání antigenu aktivovaný efektorový Tc lymfocyt může zabít (nejčastěji rozložit) cílovou buňku více způsoby. Po celou dobu stimulace TCR jsou vylučovány cytokiny, jako jsou interferon- γ (IFN- γ) a faktor nekrotizující tumory (TNF). TNF se váže na membránový receptor buněk a aktivuje kaspázovou signalizační dráhu vedoucí k apoptóze. IFN- γ vyvolá zvýšenou expresi MHC I molekul a Fas receptorů (CD59), na které se váží Fas ligandy na povrchu CD8+ buněk a tím je také aktivována kaspázová signalizace (Nagata 1996). Jiným způsobem likvidace cílové buňky je vypuštění perforinů a granzymů, které působí lytický. Tento proces je organizovaný, lytické proteiny jsou vypouštěny pomocí sekretorických lysozymů (Blott and Griffiths 2002), aby nedocházelo ke zbytečnému poškození okolních buněk.

7.1.4.2 NK buňky

NK buňky (natural killer) jsou odvozené ze stejného progenitoru jako T lymfocyty, mají obdobnou cytotoxickou funkci jako CD8+ buňky, ale patří do kategorie nespecifické imunity, protože nemají antigenně specifické receptory. Jsou rozeznávané podle exprese CD16 a/nebo CD56. Fungují na principu aktivačních a inhibičních receptorů. Pokud je silnější signál z aktivačních receptorů, lyzují cílovou buňku a naopak, pokud je silnější inhibiční signál, je NK buňka inhibována. Jejich reakce jsou namířeny proti buňkám, které neexprimují dostatečné množství MHC I. třídy, což se děje u některých virem napadených nebo nádorových buněk. V posledních letech se studiu NK buněk a jejich subpopulací charakterizovaných expresí CD8, CD56, CD2 a CD16 věnuje čím dál větší pozornost z důvodu jejich nezastupitelné úlohy při výkonu a regulaci infekční a protinádorové imunity.

7.1.4.3 NKT lymfocyty

NKT lymfocyty (Natural killer T) získaly svůj název z toho důvodu, že kromě $\alpha\beta$ TCR-CD3 komplexu nesou další receptory společné NKT a NK buňkám (CD16 a/nebo CD56) a také produkují granzymy. Jsou tedy rozpoznatelné podle svého CD3+CD16/56+ fenotypu. Jejich TCR jsou omezené co se týče specifity pro antigen, rozpoznávají lipidy a glykolipidy vázané na CD1d molekulách přítomných na APC spíše, než komplexy MHC s navázanými peptidy (Bendelac, Savage, and Teyton 2007). Hrají roli v kontrole autoimunity a v rychlé odpovědi na bakteriální infekci.

7.1.4.4 CD4+ buňky

Buňky exprimující CD4 marker na svém povrchu jsou nazývané pomocné buňky (helper, T_H) z toho důvodu, že jejich funkcí je stimulovat ostatní buňky imunitního systému, a to CD8+ buňky, B lymfocyty, makrofágy, žírné buňky, eosinofily, neutrofilů i bazofilů.

Z naivních CD4+ buněk vzniká více subpopulací v závislosti na tom, v jakém cytokinovém prostředí se vyvíjejí. Do subpopulací jsou rozdělovány podle jejich cytokinových profilů. Jde především o cytokiny IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ a TGF β (transforming growth factor). Mezi těmito subpopulacemi existuje určitá plasticita, což dokazuje to, že pokud jsou vystaveny určitým cytokinům, mohou svůj cytokinový profil změnit.

Hlavními čtyřmi subpopulacemi jsou T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} a T_{REG}. T_{H1} subpopulace produkuje hlavně IFN- γ , který aktivuje makrofágy, což vede k ničení intracelulárních parazitů. T_{H2} buňky sekretují IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, které podporují neutrofilů a produkci IgE, uplatňující se v boji proti extracelulárním parazitům. T_{H2} buňky ve folikulech sekundárních lymfatických orgánů (jinak také T_{FH} lymfocyty) stimulují B lymfocyty interakcí CD40L (CD40 ligand) a CD40 (exprimován na B lymfocytech) a produkcí IL-21 a IL-4. T_{FH} se vyznačují expresí CXCR5 (C-X-C chemokine receptor type 5) receptorem (navádí do folikulů). T_{H17} produkují IL-17a, IL-17b, IL-22 a IL-21 a hrají tak důležitou roli v likvidaci extracelulárních bakterií a hub. T_{REG} jsou rozlišovány na přirozeně se vyskytující (nT_{REG}), vznikající v thymu a na iT_{REG} (inducible), které se diferencují z naivních periferních CD4+ buněk stimulací cytokiny TGF β a IL-2 (Chen et al. 2003). T_{REG} jsou důležité pro zachování autotolerance a pro regulaci cytotoxických CD8 + T lymfocytů.

7.1.4.5 $\gamma\delta$ T lymfocyty

Pouze asi 2 % vznikajících lidských T lymfocytů exprimují $\gamma\delta$ TCR (obrázek č. 3, panel A), u jiných savčích druhů mohou však v různých obdobích života dosahovat až desítek procent cirkulujících lymfocytů. Tento alternativní receptor vzniká stejným principem jako $\alpha\beta$ TCR, tedy V(D)J rekombinací, ale rekombinují genové segmenty γ a δ . $\gamma\delta$ buňky nepokračují v diferenciaci na DP buňky, ale opouštějí thymus a putují do svých cílových tkání, většinou epiteliálních (Hayday 2000).

$\gamma\delta$ buňky jsou však DP lymfocyty regulovány, jak je ukázáno na TCR β ^{-/-} nebo pT α ^{-/-} deficitní myši. Zde dochází k zastavení diferenciaci $\alpha\beta$ buněk ve fázi DN a $\gamma\delta$ buňky

neodpovídají na aktivaci. Toto se nedělo v TCR α -/- deficitní myši, kde k blokaci vývoje $\alpha\beta$ buněk dochází až po DP fázi (Pennington et al. 2003).

$\gamma\delta$ tvoří jakýsi most mezi získanou a vrozenou imunitou, protože v nich sice probíhá V(D)J rekombinace variabilních úseků TCR a vytváří i paměťovou formu, ale pro svou aktivaci MHC nevyžadují. Rozpoznávají různé PAMP jako malé bakteriální fosfoantigeny, alkylaminy a aminobisfosfonáty a další ligandy. Také produkují cytokiny a mají cytotoxickou funkci i vůči nádorovým buňkám (Holtmeier and Kabelitz 2005).

7.2 Diferenciace a funkce B lymfocytů

B lymfocyty jsou buňky zajišťující humorální složku antigeně specifické imunity produkcí protilátek, nebo-li imunoglobulinů. Přispívají také k údržbě imunitního systému produkcí imunokompetentních cytokinů, které ovlivňují T lymfocytární diferenciaci a funkci. Pro optimální aktivaci CD4+ T buněk při infekci malými množstvími antigenu nebo autoantigeny jsou nezbytné, jak dokazuje experiment u dospělé myši ochuzené o B lymfocyty (Bouaziz et al. 2007). Rovněž regulují organizaci lymfatických tkání a fungují jako APC (LeBien and Tedder 2008).

Protilátky jsou sekretované nebo transmembránové (BCR, B-cell receptor) molekuly s vazebným místem pro antigen. Jsou to heterodimery skládající se ze dvou lehkých (L, light) a dvou těžkých (H, heavy) řetězců. Tyto řetězce jsou tvořeny dvěma funkčními doménami – variabilní a konstantní. Variabilní domény podstupují V(D)J rekombinaci (VJ rekombinaci u IgL) a tvoří vazebné místo pro antigen. Konstantní domény (Fc fragmenty) slouží jako ligandy pro Fc receptory na leukocytech. Podle typu H řetězce se dělí na 5 izotypů: IgM, IgD, IgA, IgE a IgG. Každý izotyp má svoji funkci a interaguje s určitými buňkami a molekulami imunitního systému. Funkcí rozpustných protilátek je opsonizace (navázáním na antigen k němu přitahují fagocyty), neutralizace (zneškodnění toxinů, virů a dalších patogenů vazbou na jejich receptory nutné pro adhezi nebo průnik do buněk), aktivace klasické cesty komplementu a někdy i spuštění apoptózy navázáním na určité buněčné receptory. Působí proti extracelulárním antigenům.

7.2.1 Vývoj B lymfocytů

První fáze vývoje B lymfocytů probíhá v kostní dřeni bez kontaktu s antigenem. Zde se z B buněčných progenitorů (proB), ve kterých ještě neproběhlo přeskupení genových segmentů kódujících variabilní oblast (pod vlivem různých cytokinů a nejméně deseti transkripčních faktorů), diferencují na prekurzor B lymfocytů – preB buňky. Z toho, co je

známo o regulaci tohoto procesu vyplývá, že velmi důležitou roli při vývoji B lymfocytů hraje Pax-5 a IL-7.

Pax-5 je transkripční faktor, váže promotorové sekvence v Ig lokusech a je nezbytný pro diferenciaci CLP směrem k B lymfocytům. Také se podílí na regulaci diferenciaci během celého vývoje lymfoidní řady, jak se ukázalo na zvířecích modelech s tímto genem intaktivovaným (Cobaleda et al. 2007).

IL-7 produkovaný buňkami kostní dřeně reguluje přes IL-7R α (CD127), exprimovaným už na CPL, V(D)J rekombinaci v preB buňkách. Také dodává signály k přežití a proliferaci (Nutt and Kee 2007).

Buňky, které prošly V(D)J rekombinací pro těžký řetězec Ig (μ H), na svém povrchu vystavují pre-BCR (komplex μ H a náhradního lehkého řetězce ψ Ig) a koreceptor Iga β (CD79a a CD79b). Iga β je nekovalentně vázán na BCR a jeho cytoplazmatické domény mají Src kinázovou aktivitu, která je esenciální pro BCR signalizaci a aktivaci (Reth 1989). Nutnost přítomnosti koreceptoru Iga β byla dokázána v Iga β deficitní myši, jejíž B lymfocytární vývoj se zastavil v této fázi (Pelandra et al. 2002). Po úspěšné rekombinaci μ H genů na jedné alele dochází stejně jako u T lymfocytů k alelické exkluzi, což zajišťuje monospecifitu B lymfocytů. To je důležité zejména při aktivaci antigenem (Anon. 2004).

Úspěšná exprese molekul pre-BCR a Iga β je prvním kontrolním bodem při diferenciaci B lymfocytů (Mårtensson et al. 2010). Neúspěšné buňky hynou.

V další fázi vývoje nastává rekombinace genů pro IgL a následná exprese kompletního BCR. Dochází k negativní selekci, která zajišťuje odstranění autoreaktivních B lymfocytů. Exprese BCR je nutná nejen pro rozpoznávání antigenu, ale také pro přežívání B lymfocytů v perifériích. B lymfocyty opouštějící kostní dřeň jsou nezralé a vyznačují se IgD+IgM+CD21+CD22+ fenotypem. CD21 je receptor pro C3d fragment komplementu a pro EBV (Epstein-Barrové virus). CD22 je lektin regulující B lymfocyty ve folikulech sekundárních lymfatických orgánů.

7.2.2 T-závislá B lymfocytární odpověď

Lymfocyty opouštějí kostní dřeň jako antigenem neaktivované buňky, produkující pouze dvě třídy protilátek – IgM a IgD. IgD vzniká alternativním sestřihem v oblasti kódující konstantní domény Ig. V lymfatických orgánech z nich vznikají dvě odlišné subpopulace – folikulární B (FO B) lymfocyty a lymfocyty marginální zóny (MZ B). T-závislé protilátkové odpovědi se účastní FO B. Ve folikulech sekundárních lymfatických orgánů je jim folikulárními dendritickými buňkami (FDC) předkládán antigen. Pokud se lymfocyt na

antigen váže silně, dále se diferencuje extrafolikulárně, což vede ke krátce žijícím plazmatickým buňkám produkujícím nízkoafinitní protilátky. Pokud slaběji, podstoupí afinitní maturaci v germinálních centrech (GC) (Paus et al. 2006).

Lymfocyty podstupující GC reakce jsou nazývány centroblasty. Ve folikulech dostávají signál od T_{FH} lymfocytů přes CD40 – CD40L komplex (a dalších koreceptorů), což spouští jejich proliferaci a diferenciaci, tedy germinální reakci. Komplex CD19 tvořený molekulami CD19, CD21, CD81, a CD225 spolusignalizuje s BCR a snižuje tak spodní hranici pro aktivaci antigenem (Carter and Fearon 1992). CD19 je exprimován na povrchu B lymfocytů brzy při diferenciaci a setrvává až do stadia plasmatické buňky. Plasmatické buňky silně exprimují CD27 (CD27⁺⁺).

V GC probíhá klonální expanze a izotypový přesmyk (CSR, class switch recombination), při které se rekombinují genové segmenty konstantní části těžkých řetězců imunoglobulinů (Harriman et al. 1993). Tím vzniká více protilátkových tříd a podtříd s různými funkcemi, jsou to varianty IgG, IgA a IgE. Dále probíhá somatická hypermutace (SHM, Somatic Hypermutation) variabilních částí a zároveň je znovu aktivován proces V(D)J rekombinace (Jacob et al. 1991). Centroblasty, jak se nazývají B buňky v této fázi vývoje, v GC soutěží o antigeny vystavené na APC, čímž jsou vybírány ty s nejvyšší afinitou – proces zvaný afinitní maturace – a ostatní B lymfocyty hynou (Monroe et al. 2003). CSR a SHM se účastní enzym AID (aktivací indukovaná cytidin deamináza) (M Muramatsu et al. 2000).

Vzniklé klony B lymfocytů produkující vysokoafinitní protilátky (plasmablasty) se dále dělí a diferenciují na plasmatické buňky, což je efektorové stadium B lymfocytů. Zároveň vzniká populace dlouhožijících paměťových buněk zodpovědných za imunitní paměť a sekundární reakci proti antigenu. Procesy v GC jsou regulovány transkripčními faktory Bcl-6 a BLIMP-1 (Shapiro-Shelef and Calame 2005).

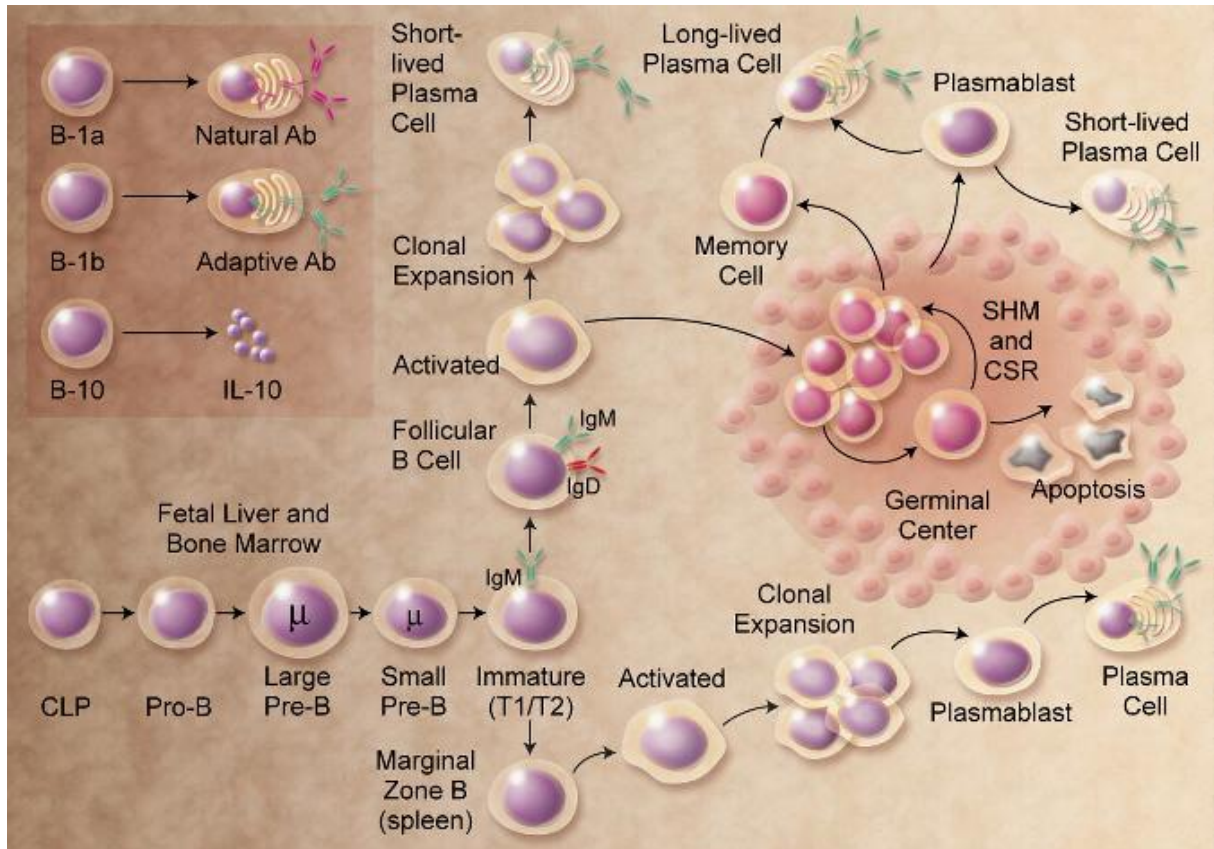
7.2.3 T-nezávislá B lymfocytární odpověď

MZ B lymfocyty jsou součástí marginální zóny sekundárních lymfatických orgánů, kterou tvoří také myelodní, dendritické a stromální buňky. Podílejí se na TI (T-independent) protilátkové odpovědi. Nezralé B lymfocyty mohou být aktivovány T-nezávislými antigeny typu I (TI-1, polyklonálně) nebo typu II.

TI-1 antigeny jsou například bakteriální lipopolysacharidy (LPS), které se ve větší koncentraci váží na nespecifické receptory B lymfocytů a působí tím jejich proliferaci a masivní produkci nízkoafinitních protilátek.

TI-2 jsou polymery (tedy struktury s opakujícími se antigenními epitopy), které vazbou na B lymfocyt způsobí překřížení Ig na jeho povrchu a tím jeho aktivaci a produkci protilátek.

Obrázek č. 2



Vývojová stádia B lymfocytů u lidí a myši. B-1a, B-1b a B-10 jsou buňky lépe charakterizované u myši, proto o nich v textu není zmínka. Adaptive Ab – adaptivní protilátky, natural Ab – přirozené protilátky, fetal liver – plodová játra, bone marrow – kostní dřeň, Short – lived – krátce žijící, long – lived – dlouze žijící, immature – nezralé. Ilustrace A.Y. Chen, převzato z LeBien and Tedder 2008.

7.3 Paměťové buňky imunity

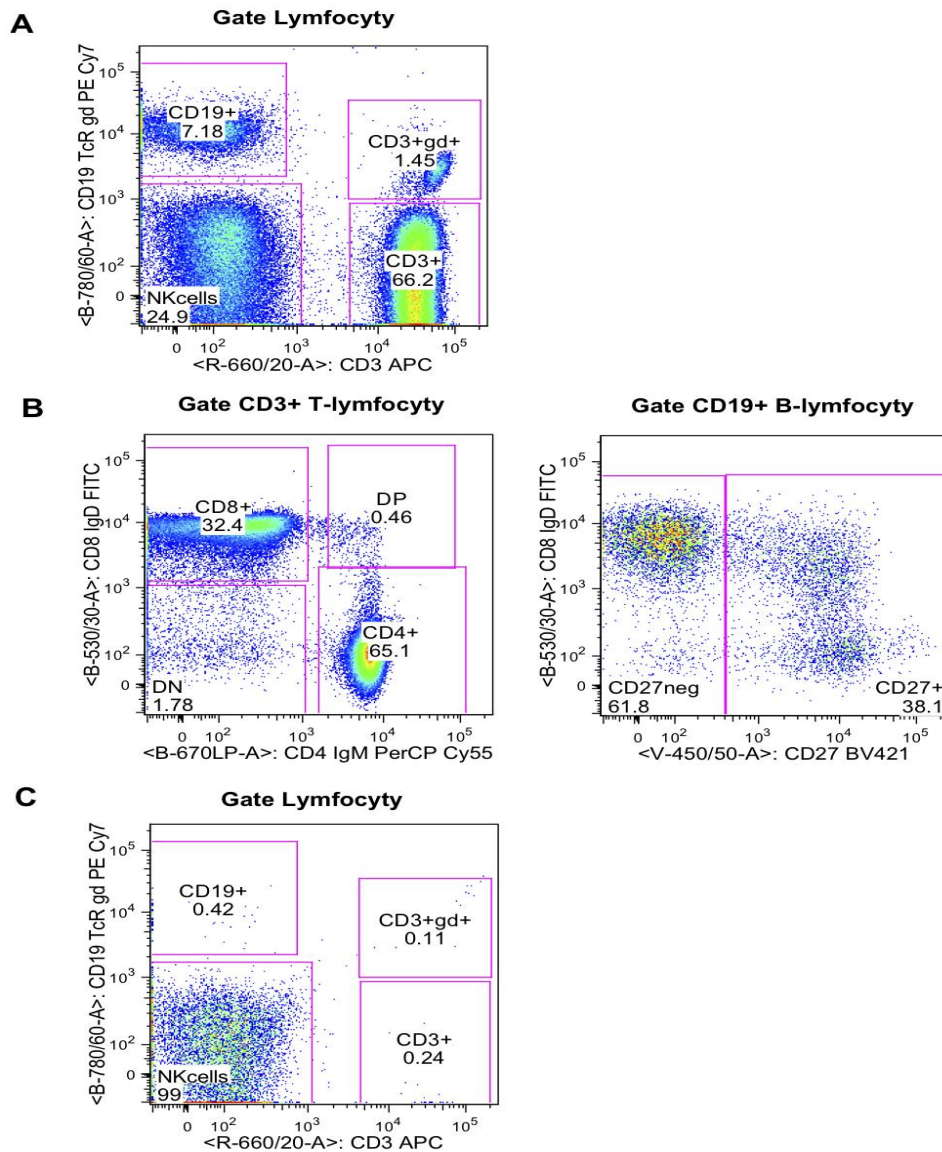
Antigenně specifická imunita má velmi důležitou schopnost imunologické paměti. Během prvního setkání s antigenem se vytvoří paměťové buňky, které jsou při opětovném setkání s tímto antigenem schopné rychlejší a účinnější reakce. Toho se využívá zejména při vakcinacích. Tato tzv. sekundární odpověď produkuje další zásobu paměťových buněk.

T lymfocyty tvoří dvě subpopulace paměťových buněk rozlišitelné podle exprese chemokinového receptoru CCR7. Jsou to T lymfocyty centrální paměti (T_{CM} , CCR7+) a efektorové paměťové (T_{EM} , CCR7-) lymfocyty. CCR7 receptor kontroluje usídlování (homing) do sekundárních lymfatických orgánů. CCR7+ buňky postrádají zánětlivé a

efektorové funkce a usazují se v sekundárních lymfatických orgánech, kde při opětovném setkání s antigenem aktivují FDC a poskytují pomoc B lymfocytům. CCR7- buňky cirkulují a při sekundární odpovědi mohou vstoupit do periferních tkáních a okamžitě zahájit sekundární zánětlivou a cytotoxickou odpověď (Sallusto et al. 1999).

Také u B lymfocytů nacházíme dvě hlavní paměťové subpopulace: paměťové B lymfocyty a paměťové plazmocyty. Tyto se dělí na další subpopulace (IgM-IgD-, IgM+IgD+ a IgM+IgD-), ale všechny exprimují receptor CD27 z TNF rodiny (Yoshida et al. 2010). Paměťové buňky nevykazují kontinuálně žádné efektorové funkce, pro zapojení do imunitní odpovědi musí být restimulovány. Jsou flexibilní, mohou být regulovatelné množstvím antigenu a imunologickým prostředím. Paměťové plazmocyty se usídlují v kostní dřeni jako dále se nedělící buňky, které ztratily schopnost rozeznávat cílový antigen, jsou tedy antigenem neregulovatelné. Odtud produkují efektorové molekuly (protilátky) po desítky let. Obě tyto subpopulace prošly diferenciací v GC.

Obrázek č. 3



Obrázek ukazuje data ze vzorku lidské periferní krve měřeného průtokovým cytometrem. **A)** CD3+ jsou T lymfocyty, zdatelně oddělená populace $\gamma\delta$ T lymfocytů. CD19+ jsou B lymfocyty a CD3-CD19- NK buňky. **B)** Na prvním grafu je ukázáno rozdělení T lymfocytů na subpopulace TC (CD8+) a TH (CD4+), DP a DN normálně tvoří jen malé procento buněk. Druhý graf ukazuje rozdělení B lymfocytů podle exprese CD27 a IgD. CD27 negativní buňky jsou naivní B lymfocyty, CD27 pozitivní buňky tvoří 3 populace – plasmablasty (IgD+), plasmatické buňky (CD27++IgD-) a paměťové buňky (CD27+IgD-). **C)** Vzorek periferní krve pacienta se SCID. Chybí CD3+ i CD19+, tedy B i T lymfocyty.

8 Imunodeficiency

Imunodeficiency nazýváme stav, při kterém jedna nebo více složek imunitního systému podléhá chybné diferenciaci nebo regulaci anebo vykazuje nedostatečnou funkci, v důsledku čehož dochází k poruchám obranyschopnosti a autoregulace organismu. Ten se tak nemůže adekvátně bránit proti infekcím, může vznikat i náchylnost k lymfoproliferativním jevům či k autoimunitním reakcím. Imunodeficiency se dělí na primární, nebo-li vrozené a sekundární, získané během života. Obě skupiny můžeme dále dělit na deficiency, týkající se antigeně specifické nebo nespecifické imunity. Protože předmětem zájmu této práce jsou subpopulace lymfocytů a jejich role při vybraných primárních imunodeficiency, budeme se dále zabývat deficiency antigeně specifické imunity, kterou tyto buňky zajišťují.

Primární imunodeficiency je vrozený stav způsobený mutací jednoho nebo více genů kódujících proteiny účastnících se imunitní obrany. Důsledkem takové mutace je částečná nebo absolutní nefunkčnost některých imunitních mechanismů. Bylo identifikováno kolem 150 různých mutací, postihujících více než 120 genů, které způsobují různě závažné formy primárních imunodeficiency (Geha et al. 2007).

Postupné objevování genů mutovaných při primárních imunodeficiency a zkoumání následků těchto mutací hraje velmi důležitou roli při odhalování funkcí jednotlivých buněk a molekul imunitního systému.

8.1 Těžký kombinovaný imunodeficiency (SCID)

Do kategorie SCID (severe combined immunodeficiency) jsou řazeny primární deficiency způsobené velmi heterogenními příčinami, všechny však vedou k podobnému fenotypu. Je to stav charakteristický absencí T buněčné linie. Podle toho, o jakou molekulární příčinu se jedná, bývá narušena i diferenciací ostatních linií, jako jsou B lymfocyty, NK buňky a někdy také, jako důsledek, i funkce vrozené imunity. SCID je děděn vždy recesivně, zřejmě z důvodu, že dominantní alela by se v populaci neudržela vzhledem k tomu, že se postižení jedinci většinou nedožívají reprodukčního věku.

8.1.1 Defekty V(D)J rekombinace

V(D)J rekombinace je zahajována komplexem rekombináz RAG-1 a RAG-2, které provedou dvouřetězcový zlom v signálních sekvencích přítomných na V, D i J segmentech. Geny kódující tyto rekombinázy jsou exprimovány pouze ve zralých lymfocytech, protože V(D)J rekombinace je omezena pouze na tyto buňky. Obě linie, B i T lymfocyty, používají stejný rekombinační aparát. Funkce těchto proteinů byla doložena jejich vpravením do

fibroblastů, kde byla rekombinace následně započata také (Oettinger et al. 1990). RAG-1 a RAG-2 proteiny jsou velmi konzervované, provádějí rekombinaci genů pro TCR a Ig ve všech organismech se specifickou imunitou.

8.1.1.1 SCID T-B-

Vyřazení RAG u myši způsobilo kompletní absenci maturovaných B a T lymfocytů, bez jakéhokoliv dopadu na NK buňky, které nebyly ovlivněny proto, že u nich V(D)J rekombinace neprobíhá z toho důvodu, že antigenně specifické receptory nepoužívají. Stejně tak u lidí, pokud dojde v obou alelách k mutaci způsobující, že proteiny RAG-1 a RAG-2 nejsou vůbec exprimovány, dochází k absenci B a T lymfocytů.

SCID T-B- je velmi vážný stav. Pacienti bez léčby, kterou je transplantace kostní dřeně, podléhají infekcím do dvanáctého měsíce života. Transplantace je často neúspěšná, protože přítomné funkční NK buňky často způsobí odmítnutí štěpu. Navíc bez adekvátního přípravného režimu před transplantací mohou stále přítomné hostitelské thymocyty snižovat úspěch přihojení štěpu (Szabolcs et al. 2010).

Cytometrická analýza

Chybí T-lymfocyty (CD3+CD4+ i CD3+CD8+), B-lymfocyty (CD19+ IgD+)

8.1.1.2 Omennův syndrom (OS)

Pokud mutace rekombinačních proteinů nevede k úplnému zastavení V(D)J rekombinace, ale pouze k jejímu utlumení a tedy částečnému fungování, je fenotyp odlišný od SCID T-B-. Tento stav je nazýván Omennův syndrom a je charakteristický absencí B lymfocytů, expanzí oligoklonálních T_H2 lymfocytů a tím způsobenou eosinofilií a zvýšenou hladinou IgE (Villa et al. 1998). Ve tkáních, hlavně v kůži a střevním endotelu dětí trpících OS, bylo identifikováno velké množství CD30+ buněk, což je fenotyp, který vykazují T_H2 buňky, zatímco v tkáních zdravých kontrolních jedinců byla exprese tohoto receptoru z rodiny TNF extrémně malá (Chilosi et al. 1996). Zvýšené množství T_H2 při OS dokazuje také cytokinový profil se zvýšenou hladinou IL-4, IL-5 a IL-10.

Cytometrická analýza

zvýšený počet T_H lymfocytů (CD4+CD30+), chybí B lymfocyty (CD19+IgD+)

8.1.2 NHEJ deficit

NHEJ (nonhomologous double-strand end-joining repair pathway) je děj, ve kterém komplex proteinů spojuje dvouřetězcové zlomy způsobené RAG-1 a RAG-2 rekombinázami

(Bassing and Alt 2004). Komplex je tvořen více proteiny, které jsou postupně objevovány díky identifikaci mutovaných genů při imunodeficitech. Nejdříve jsou oba řetězce fosforylovány DNA protein kinázami (DNA PK), protein Artemis pak štěpí vlásenku, která po fosforylaci spojuje oba řetězce v kódujících koncích (Villartay, Fischer, and Durandy 2003) a nakonec DNA ligáza IV spojí zlomy (O'Driscoll et al. 2001). Další z identifikovaných proteinů tohoto komplexu je Cernunnos, jehož molekulární funkce při spojování konců však zatím není známa.

Pacienti s defektním NHEJ trpí B i T lymfopenií, zvýšenou náchylností k rakovině kvůli citlivosti k ionizačnímu záření a také růstovými a vývojovými defekty, protože tyto proteiny jsou exprimovány i při jiných procesech v ostatních buněčných typech (Fischer 2007).

Cytometrická analýza

snížené množství T lymfocytů (CD3+CD4+ i CD3+CD8+) a B-lymfocytů (CD19+ IgD+)

8.1.3 Deficitní cytokinová signalizace

Cytokiny jsou malé signální molekuly se signalizační funkcí (produkované nejen buňkami imunitního systému) a jejich úkolem je umožňovat komunikaci mezi buňkami a také jejich regulaci. Protože cytokinová regulace je jedním z klíčových mechanismů umožňujících specifickou odpověď kontrolou buněčné proliferace, diferenciaci, aktivace i apoptózy, nastává při deficitu klíčových cytokinů imunodeficitní stav.

8.1.3.1 SCID T-B+

Nejčastější formou těžkých kombinovaných imunodeficitů je SCID T-B+. Projevuje se absencí T lymfocytů v periferní krvi a normálními nebo sníženými počty B lymfocytů. SCID T-B+ je způsoben recesivní mutací v X-vázaném genu pro γc řetězec cytokinových receptorů, který je společný receptorům pro IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 a IL-15. Jiná mutace způsobující tento stav může být v genu pro JAK-3 kinázu, která umožňuje signalizaci vedoucí přes cytokinové receptory, jejichž součástí je γc řetězec (Notarangelo et al. 2000).

Jelikož signalizace přes tyto receptory (hlavně IL-2 (Noguchi et al. 1993) a IL-7 (Lundström, Fewkes, and Mackall) je nezbytná pro vývoj T lymfocytů a podílí se i na vývoji B lymfocytů, je jejím defektem způsoben velmi vážný stav, který bez transplantace nebo genové terapie vede ke smrti (Buckley 2004).

Cytometrická analýza

absence T lymfocytů (CD3+CD4+ i CD3+CD8+), variabilně ovlivněný počet B lymfocytů (CD19+ IgD+)

8.1.3.2 *Retikulární dysgeneze (RD)*

RD je jeden z nejzávažnějších lidských imunodeficitů způsobených mutací genu pro mitochondriální adenylát kinázu 2 (AK2), což se projevuje absencí nebo velmi sníženou expresí jeho produktu. Je to autosomálně recesivně děděné onemocnění. Při RD dochází k zástavě diferenciaci myeloidní řady (neodpovídá na granulocyty stimulující faktor G-CSF), což vede k těžké neutropenii. Neutropenie je doprovázena těžkou T a NK lymfopenií a různě ovlivněnou B lymfocytární řadou, zatímco počet monocytů bývá normální nebo lehce snížený (Lagresle-Peyrou et al. 2009).

Nedostatek polymorfonukleárních granulocytů způsobuje nástup těžkých infekcí dříve než u ostatních forem SCID (Heltzer et al. 2007). RD je doprovázena sensorineurální hluchotou, což vysvětluje to, že AK2 je specificky exprimována ve vnitřním uchu. Jedinou dostupnou léčbou je transplantace HSC, bez léčby pacient umírá do 3 měsíců po narození, většinou následkem sepse.

Cytometrická analýza

absence granulocytů (CD15+), absence T lymfocytů (CD3+CD4+ i CD3+CD8+) a NK buněk (CD16+CD56+)

8.2 **Imunodeficity protilátkové**

Humorální imunodeficity mohou být způsobeny blokem v diferenciaci B lymfocytů nebo přímo v produkci protilátek. Projevují se hypogamaglobulinémií, tedy nedostatkem jedné nebo více tříd imunoglobulinů, náchylností k bakteriálním infekcím a nedostatkem produkce protilátek při odpovědi na vakcinaci. Při některých typech se objevuje náchylnost k autoimunitním a maligním onemocněním.

Jelikož během třetího trimestru těhotenství dochází k transplacentárnímu přenosu Ig z matky do plodu a tyto Ig chrání dítě v prvních měsících života, než se stihne vyvinout specifická imunita, tyto deficity se projevují později než imunodeficiencie kombinované a T lymfocytární. Jejich příčiny na molekulární úrovni ještě nejsou zcela objasněny a jejich závažnost se liší od velmi těžkého stavu při absenci B lymfocytů a tím úplné agamaglobulinemii po téměř normální sérum se selektivním deficitem jedné třídy protilátek.

8.2.1 Agamaglobulinemie vázaná na X chromozom (XLA)

XLA neboli Brutonova agamaglobulinemie je deficit způsobený mutací genu pro Btk (Brutonova tyrosin kináza) na X chromozomu. To způsobuje blokování vývoje B lymfocytů v preB fázi, i když ne absolutní, jak dokázal experiment s imunofluorescenčním barvením, který ukázal IgM a IgD pozitivní buňky v krvi pacientů s XLA (Conley 1985). XLA se projevuje absencí plazmatických buněk a tedy i nepřítomností imunoglobulinů (nebo velmi sníženým titrem všech tříd Ig) a lymfatické orgány jsou málo vyvinuty.

První příznaky se projevují do prvního roku života. Jsou to náchylnost k infekci enkapsulovanými bakteriemi, sepse a jiné (Chun et al. 2008). Léčbou je intravenózní podávání imunoglobulinů a potlačování infekcí antibiotiky.

Cytometrická analýza:

Absence B lymfocytů (CD19+IgD+)

8.2.2 CVID (Common Variable Immunodeficiency)

Běžný variabilní imunodeficit je nejběžnější skupinou humorálních deficitů, způsobenou velmi heterogenní skupinou příčin. Charakteristické jsou opakované bakteriální infekce z důvodu hypogamaglobulinemie. Počet T lymfocytů je normální, počet plazmatických a paměťových B lymfocytů je snížen. Ne všechny molekulární příčiny CVID jsou známy, ale některé už popsány byly.

Jednou z nich je recesivně děděná delece v genu *ICOS* (inducible costimulator), který je exprimován na čerstvě aktivovaných T_H1 a T_H2 T buňkách, které dodávají pomocný signál B lymfocytům při jejich zrání (van Berkel and Oosterwegel 2006). Nebyl detekován vliv mutace *ICOS* na T lymfocytární populace, zato B lymfocyty vykazovaly redukovaný počet naivních, efektorových i paměťových subpopulací, což poukazuje na kostimulační aktivitu *ICOS* při pomoci B lymfocytům (Grimbacher et al. 2003). Protože hustota exprese membránových *ICOS* proteinů koreluje s cytokinovou expresí (IL-10, IL-2, IL-4, IL-5, IL-13), je kromě sníženého počtu B lymfocytů narušena i exprese těchto interleukinů (van Berkel and Oosterwegel 2006).

Další známou příčinou CVID je homozygotní mutace molekuly CD19. CD19 se účastní signalizace během B buněčné diferenciace, jak bylo posáno výše. CD19 deficitní pacienti mají v periferní krvi normální množství B lymfocytů, ale není detekována žádná exprese CD19 a je snížena exprese CD21, což vede k abnormálním (sníženým) reakcím na antigen.

Cytometrická analýza:

normální či snížený počet CD19+ buněk, chybění plasmablastů (CD19+CD27++CD38++), snížení procenta paměťových B-buněk (CD19+CD27+)

Vzácné dědičné formy: CD19 deficit, ICOS deficit, CD81 deficit

8.2.3 Přejídná dětská hypogamaglobulinémie

Přejídná hypogamaglobulinémie je zpoždění v produkci IgG, méně často i jiné třídy Ig po narození. Při normálním stavu tato produkce začíná do 2 měsíců života. Jelikož Ig od matky jsou organismem spotřebovány do 3-5 měsíců, projeví se tato nemoc větší náchylností k infekcím po dobu, než se aktivuje syntéza IgG, což bývá od 16. do 30. měsíce života. Molekulární příčina zatím není známa. Léčí se antibiotiky a imunoglobuliny (Moise et al. 2010).

8.2.4 Selektivní IgA imunodeficit

IgA deficit je vzhledem k tomu, že se objevuje se stejnou frekvencí u mužů i žen, autozomálně dědičná, a to recesivně i dominantně (Ballow 2002). Je to jedna z nejčastějších primárních imunodeficitů. Je charakteristický sníženým množstvím IgA nebo jeho úplnou absencí v těle. Bývá často asymptomatický, ale pokud se projeví, pacient většinou trpí gastrointestinálními a plicními infekcemi. Také byla pozorována náchylnost k autimunitním onemocněním a je často spojený s atopií (Cunningham-Rundles 2001).

B buňky sice exprimují IgA, ale nezralého fenotypu s koexpresí IgM a IgD, nejsou totiž schopné dozrát v IgA-sekretující plazmatické buňky (Conley and Cooper 1981). Molekulární příčina zatím není objasněná, ale zřejmě postihuje už HSC, protože je přenositelný transplantací kostní dřeně (Hammarström et al. 1985).

Cytometrická analýza:

Chybí plasmatické buňky produkující IgA (CD19+CD27++CD38++IgA+)

8.3 Funkční poruchy T lymfocytů

Funkční poruchy T lymfocytů mají za následek kombinované imunodeficiencie. Stejně jako SCID jsou způsobované různými mutacemi, ale narozdíl od SCID se projevují velmi heterogenními fenotypy.

8.3.1 Syndrom holých lymfocytů (BLS, Bare Lymphocyte Syndrom)

BLS je způsobován absencí MHC II nebo MHC I molekul na povrchu buněk.

8.3.1.1 MHC I deficit

Tato choroba se projevuje sníženou expresí MHC I. třídy na povrchu buněk. Je způsobována heterogenními příčinami. Nejlépe charakterizovanou je chybná exprese heterodimeru TAP (transporter associated with antigen processing), jehož úkolem je translokovat peptidy degradované proteazomem v cytosolu do endoplasmatického retikula, kde se pak tyto 8-11 aminokyselinové peptidy kompletují s MHC I molekulou (Gadola et al. 2000).

Mutace v TAP1, TAP2 nebo v obou podjednotkách se projevují stejnými příznaky; náchylností k bakteriálním infekcím a kožními problémy. CD8+ T lymfocyty byly u pacientů detekovány ve sníženém množství, naproti tomu $\gamma\delta$ a NK buňky jsou přítomny ve zvýšené míře. U některých pacientů existují i jejich autoreaktivní formy, které byly nalezeny v kožních lézích (Moins-Teisserenc et al. 1999).

Cytometrická analýza:

snížené množství T_C lymfocytů (CD4-CD8+), zvýšené množství NK buněk a $\gamma\delta$ buněk (CD16+CD56+ a $\gamma\delta$ CD3+)

8.3.1.2 MHC II deficit

MHCII deficit je způsobený mutací genu pro regulační faktor kontrolující expresi této molekuly (de Préval et al. 1985). Je to autozomálně recesivně děděná nemoc. Specifická imunita nereaguje na cizí antigen, protože APC chybí MHCII a proto nejsou schopné ho prezentovat B a T buňkám. Toto vede k abnormální selekci a maturaci CD4+ buněk, což ovlivňuje vývoj B lymfocytů a následně k velmi snížené produkci protilátek (Villard et al. 2001)

Na tuto nemoc pacient bez transplantace umírá do čtvrtého roku života (Klein et al. 1993).

Cytometrická analýza:

absence T_H lymfocytů (CD4+CD8-) a MHC II glykoproteinů

8.3.2 Hyper IgM syndrom

Mutace v genech kódující proteiny účastníci se izotypového přesmyku, způsobují fenotyp s normálním nebo lehce zvýšenou hladinou IgM a se sníženou hladinou ostatních izotypů protilátek. AID a CD40L deficiencie jsou příkladem takových mutací.

Deficit CD40 ligandu (CD40L, CD154) neboli TRAP (TNF-receptor Associated Protein) proteinu je X-vázaná mutace. Protože interakce CD40/CD40L spouští izotypový

přesmyk z IgM na IgE, IgA a IgG, projevuje se tato choroba značně sníženým nebo nulovým množstvím těchto protilátek (Korthäuer et al. 1993). Hladiny IgM a IgD jsou normální nebo zvýšené. B lymfocyty jsou plně funkční, jak bylo dokázáno aktivací B lymfocytů pacienta s touto chorobou in vitro (Durandy et al. 1993). U většiny pacientů je také detekována absence CD27+ paměťových buněk.

AID je DNA-editující enzym, exprimovaný pouze v aktivovaných B lymfocytech v sekundárních lymfatických orgánech (Masamichi Muramatsu et al. 1999). Funkcí AID je deaminace deoxycytidinu na deoxyuracil a účast při SHM a CSR. Při jejím deficitu jsou tyto procesy defektní (Gadola et al. 2000) a germinální centra jsou zvětšená z důvodu masivní proliferace B lymfocytů. Toto dokazuje nutnost AID aktivity při těchto procesech a při regulaci terminální diferenciaci B lymfocytů (Okazaki et al. 2002). CD27+ buňky exprimují pouze IgM a IgD.

Cytometrická analýza:

CD40L deficit:

absence CD27+ buněk, absence CD40L (CD154) po stimulaci

AID deficit

chybí CD27+IgA+, CD27+IgG+, CD27+IgE+

8.3.3 Lymfoproliferativní X-vázaný syndrom

Lymfoproliferativní X-vázaný syndrom (XLP, X-linked lymphoproliferative disorder) charakteristický EBV-asociovanou hemofagocytickou lymfohistiocytózou (HLH, nevhodná reakce CD8+ buněk a makrofágů), lymfomy a dysgamaglobulinémií. Bez léčby, kterou je allogenní transplantace HSC, způsobuje předčasné úmrtí. XLP je způsoben dvěma možnými mutacemi.

První je mutace proteinu SAP (slam-associated protein) z receptorové rodiny SLAM (signalling lymphocyte activation molecule) účastnící se intracelulární signalizace. SLAM proteiny hrají kritickou roli při vývoji lymfocytů a výkonu jejich efektorových funkcí, účastní se TD imunitní odpovědi, CD8+ cytotoxických reakcí a při vývoji NKT buněk (Ma, Nichols, and Tangye 2007) a tyto funkce jsou při deficitu narušeny. SAP deficiencie také zabraňuje stabilní interakci CD4+ T buněk s B lymfocyty v germinálních centrech, což vede k tomu, že B lymfocyty nedostávají dostatečný pomocný signál, i když funkce CD4+ buněk jsou jinak normální (Qi et al. 2008). Historicky je za spouštěč tohoto imunodeficitu považován EBV, ne všechny projevy však jsou s ním asociovány.

Druhou mutací způsobující stejný fenotyp je deficit XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), člen IAP (inhibitor of apoptosis) rodiny. Jelikož regulovaná apoptóza je velmi důležitá při udržování homeostáze lymfocytů, její defekty vedou k lymfoproliferativním poruchám zahrnujícím HLH a dalším projevům, jako je například zvýšená apoptóza lymfocytů v reakci na různé stimuly například přes TCR-CD3 komplex, CD95 a další receptory. Sejně jako u SAP deficiencie je také zaznamenána absence NKT lymfocytů, což indikuje důležitost XIAP při jejich vývoji a přežívání (Rigaud et al. 2006)

9 Závěr

Protože imunitní systém hraje jednu z nejdůležitějších rolí pro udržení homeostázy organismu, je mnoho úsilí věnováno studiu vzniku a funkcí jeho jednotlivých složek a jejich vzájemné interkace. Primární imunodeficity jsou sice jen relativně málo častou příčinou poruch postihujících imunitu, ale ukázaly se být velmi účinným nástrojem v objasňování její struktury a funkce. Analýzou mutací způsobujících primární imunodeficity a přiřazováním takto rozpoznávaných genů k projevům, bylo dosud možné identifikovat velký počet genů a jejich produktů, účastnících se imunitní odpovědi. Porozumět tomu, jak imunitní systém funguje, je důležité zejména z důvodu objevování možných léčebných metod při infekcích, autoimunitních chorobách a nádorových onemocnění. I přes velký pokrok v tomto oboru v posledních letech, je stále mnoho příčin těchto onemocnění záhadou a o fungování některých imunitních mechanismů se vedou pouze dohady. Velmi účinnou metodou v tomto snažení se ukázala být průtoková cytometrie, umožňující multiparametrickou analýzu fluorescenčně značených buněk, vedoucí k identifikaci dříve netušené heterogenity lymfoidního kompartmentu krvetvorby. Díky jednoznačnému rozlišení lymfocytárních populací a jejich subpopulací, možnosti jejich třídění a funkční analýzy včetně genové exprese, se podařilo identifikovat dříve neznámé nebo přehlížené subpopulace, které mohou být rozhodující při regulaci obrany proti infekci, nádorům a autoimunitním stavům. Další charakterizace příčin dosud neobjasněných primárních imunodeficitů, často spíše náhodně fenomenologicky přiřazovaných do stejné skupiny (například CVID) je tedy vysoce žádoucí z teoretického hlediska, ale i praktických důvodů.

10 Použitá literatura

- Anon. 2004. "The Lingering Enigma of the Allelic Exclusion Mechanism." *Cell* 118 (5) (September 3): 539–544. doi:10.1016/j.cell.2004.08.023.
- Ballow, Mark. 2002. "Primary Immunodeficiency Disorders: Antibody Deficiency." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109 (4) (April): 581–591.
- Bassing, Craig H., and Frederick W. Alt. 2004. "The Cellular Response to General and Programmed DNA Double Strand Breaks." *DNA Repair* 3 (8–9) (August): 781–796. doi:10.1016/j.dnarep.2004.06.001.
- Bendelac, Albert, Paul B Savage, and Luc Teyton. 2007. "The Biology of NKT Cells." *Annual Review of Immunology* 25: 297–336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
- van Berkel, Miranda E A T, and Mariëtte A Oosterwegel. 2006. "CD28 and ICOS: Similar or Separate Costimulators of T Cells?" *Immunology Letters* 105 (2) (June 15): 115–122. doi:10.1016/j.imlet.2006.02.007.
- Blott, Emma J., and Gillian M. Griffiths. 2002. "Secretory Lysosomes." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (2) (February 1): 122–131. doi:10.1038/nrm732.
- von Boehmer, H. 1994. "Positive Selection of Lymphocytes." *Cell* 76 (2) (January 28): 219–228.
- Bouaziz, Jean-David, Koichi Yanaba, Guglielmo M Venturi, Yaming Wang, Roland M Tisch, Jonathan C Poe, and Thomas F Tedder. 2007. "Therapeutic B Cell Depletion Impairs Adaptive and Autoreactive CD4+ T Cell Activation in Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (52) (December 26): 20878–20883. doi:10.1073/pnas.0709205105.
- Buckley, Rebecca H. 2004. "Molecular Defects in Human Severe Combined Immunodeficiency and Approaches to Immune Reconstitution." *Annual Review of Immunology* 22: 625–655. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104614.
- Carter, R. H., and D. T. Fearon. 1992. "CD19: Lowering the Threshold for Antigen Receptor Stimulation of B Lymphocytes." *Science* 256 (5053) (April 3): 105–107. doi:10.1126/science.1373518.
- Cobaleda, C[sar], Alexandra Schebesta, Alessio Delogu, and Meinrad Busslinger. 2007. "Pax5: The Guardian of B Cell Identity and Function." *Nature Immunology* 8 (5) (April 17): 463–470. doi:10.1038/ni1454.
- Conley, M E. 1985. "B Cells in Patients with X-linked Agammaglobulinemia." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 134 (5) (May): 3070–3074.
- Conley, M E, and M D Cooper. 1981. "Immature IgA B Cells in IgA-deficient Patients." *The New England Journal of Medicine* 305 (9) (August 27): 495–497. doi:10.1056/NEJM198108273050905.
- Cresswell, P. 1994. "Assembly, Transport, and Function of MHC Class II Molecules." *Annual Review of Immunology* 12: 259–293. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001355.
- Cunningham-Rundles, C. 2001. "Physiology of IgA and IgA Deficiency." *Journal of Clinical Immunology* 21 (5) (September): 303–309.
- Durandy, A, C Schiff, J Y Bonnefoy, M Forveille, F Rousset, G Mazzei, M Milili, and A Fischer. 1993. "Induction by anti-CD40 Antibody or Soluble CD40 Ligand and Cytokines of IgG, IgA and IgE Production by B Cells from Patients with X-linked Hyper IgM Syndrome." *European Journal of Immunology* 23 (9) (September): 2294–2299. doi:10.1002/eji.1830230936.
- Fischer, Alain. 2007. "Human Primary Immunodeficiency Diseases." *Immunity* 27 (6) (December): 835–845. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.012.
- Fowlkes, B. J., and Ellen A Robey. 2002. "A Reassessment of the Effect of Activated Notch1 on CD4 and CD8 T Cell Development." *The Journal of Immunology* 169 (4) (August 15): 1817–1821.
- Gadola, S D, H T Moins-Teisserenc, J Trowsdale, W L Gross, and V Cerundolo. 2000. "TAP Deficiency Syndrome." *Clinical and Experimental Immunology* 121 (2) (August): 173–178. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01264.x.
- Geha, Raif S., Luigi D. Notarangelo, Jean-Laurent Casanova, Helen Chapel, Mary Ellen Conley, Alain Fischer, Lennart Hammarström, et al. 2007. "Primary Immunodeficiency Diseases: An Update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases

- Classification Committee." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (4) (October): 776–794. doi:10.1016/j.jaci.2007.08.053.
- Gerber, David, Laurent Boucontet, and Pablo Pereira. 2004. "Early Expression of a Functional TCRbeta Chain Inhibits TCRgamma Gene Rearrangements Without Altering the Frequency of TCRgammadelta Lineage Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (4) (August 15): 2516–2523.
- Grimbacher, Bodo, Andreas Hutloff, Michael Schlesier, Erik Glocker, Klaus Warnatz, Ruth Dräger, Hermann Eibel, et al. 2003. "Homozygous Loss of ICOS Is Associated with Adult-onset Common Variable Immunodeficiency." *Nature Immunology* 4 (3) (March): 261–268. doi:10.1038/ni902.
- Hammarström, Lennart, Olle Ringdén, Berit Lönnqvist, C.I.Edvard Smith, and Thomas Wiebe. 1985. "TRANSFER OF IgA DEFICIENCY TO A BONE-MARROW-GRAFTED PATIENT WITH APLASTIC ANAEMIA." *The Lancet* 325 (8432) (April): 778–781. doi:10.1016/S0140-6736(85)91446-1.
- Harriman, H. VÅ¶lk, N. Defranoux, and M. Wabl. 1993. "Immunoglobulin Class Switch Recombination." *Cell* 11 (I): 361–384.
- Hayday, A C. 2000. "[gamma][delta] Cells: a Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection." *Annual Review of Immunology* 18: 975–1026. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.975.
- Heltzer, Meredith Lee, Michele Paessler, Leslie Raffini, Nancy Bunin, and Elena Elizabeth Perez. 2007. "Successful Haploidentical Bone Marrow Transplantation in a Patient with Reticular Dysgenesis: Three-year Follow-up." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (4) (October): 950–952. doi:10.1016/j.jaci.2007.07.026.
- Herman, A, J W Kappler, P Marrack, and A M Pullen. 1991. "Superantigens: Mechanism of T-cell Stimulation and Role in Immune Responses." *Annual Review of Immunology* 9: 745–772. doi:10.1146/annurev.iy.09.040191.003525.
- Holtmeier, Wolfgang, and Dieter Kabelitz. 2005. "Gammadelta T Cells Link Innate and Adaptive Immune Responses." *Chemical Immunology and Allergy* 86: 151–183. doi:10.1159/000086659.
- Chen, WanJun, Wenwen Jin, Neil Hardegen, Ke-Jian Lei, Li Li, Nancy Marinos, George McGrady, and Sharon M Wahl. 2003. "Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF-beta Induction of Transcription Factor Foxp3." *The Journal of Experimental Medicine* 198 (12) (December 15): 1875–1886. doi:10.1084/jem.20030152.
- Chilosi, Marco, Fabio Facchetti, Luigi D Notarangelo, Sergio Romagnani, Gianfranco Del Prete, Fabio Almerigogna, Marco De Carli, et al. 1996. "CD30 cell expression and abnormal soluble CD30 serum accumulation in Omenn's syndrome: Evidence for a T helper 2- mediated condition, CD30 cell expression and abnormal soluble CD30 serum accumulation in Omenn's syndrome: Evidence for a T helper 2- mediated condition." *European Journal of Immunology, European Journal of Immunology* 26, 26 (2, 2) (February 1): 329, 329–334, 334. doi:10.1002/eji.1830260209, 10.1002/eji.1830260209.
- Chun, Jin-Kyong, Taek Jin Lee, Jae Woo Song, John A Linton, and Dong Soo Kim. 2008. "Analysis of Clinical Presentations of Bruton Disease: A Review of 20 Years of Accumulated Data from Pediatric Patients at Severance Hospital." *Yonsei Medical Journal* 49 (1) (February 29): 28–36. doi:10.3349/ymj.2008.49.1.28.
- Jacob, J, G Kelsoe, K Rajewsky, and U Weiss. 1991. "Intraclonal Generation of Antibody Mutants in Germinal Centres." *Nature* 354 (6352) (December 5): 389–392. doi:10.1038/354389a0.
- Janeway, C A, Jr. 1994. "Thymic Selection: Two Pathways to Life and Two to Death." *Immunity* 1 (1) (April): 3–6.
- Klein, C, B Lisowska-Groszpiere, F LeDeist, A Fischer, and C Griscelli. 1993. "Major Histocompatibility Complex Class II Deficiency: Clinical Manifestations, Immunologic Features, and Outcome." *The Journal of Pediatrics* 123 (6) (December): 921–928.

- Kopp, Hans-Georg, Scott T Avecilla, Andrea T Hooper, and Shahin Rafii. 2005. "The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization." *Physiology* 20 (5) (October 1): 349–356. doi:10.1152/physiol.00025.2005.
- Korthäuer, U, D Graf, H W Mages, F Brière, M Padayachee, S Malcolm, A G Ugazio, L D Notarangelo, R J Levinsky, and R A Kroccek. 1993. "Defective Expression of T-cell CD40 Ligand Causes X-linked Immunodeficiency with hyper-IgM." *Nature* 361 (6412) (February 11): 539–541. doi:10.1038/361539a0.
- Lagresle-Peyrou, Chantal, Emmanuelle M. Six, Capucine Picard, Frédéric Rieux-Laucat, Vincent Michel, Andrea Ditadi, Corinne Demerens-de Chappedelaine, et al. 2009. "Human Adenylate Kinase 2 Deficiency Causes a Profound Haematopoietic Defect Associated with Sensorineural Deafness." *Nature Genetics* 41 (1) (January): 106–111. doi:10.1038/ng.278.
- LeBien, Tucker W., and Thomas F. Tedder. 2008. "B Lymphocytes: How They Develop and Function." *Blood* 112 (5) (September 1): 1570–1580. doi:10.1182/blood-2008-02-078071.
- Lundström, Wangko, Natasha M. Fewkes, and Crystal L. Mackall. "IL-7 in Human Health and Disease." *Seminars in Immunology* (0). doi:10.1016/j.smim.2012.02.005. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532312000206>.
- Ma, Cindy S, Kim E Nichols, and Stuart G Tangye. 2007. "Regulation of Cellular and Humoral Immune Responses by the SLAM and SAP Families of Molecules." *Annual Review of Immunology* 25: 337–379. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141651.
- Mårtensson, Inga-Lill, Nina Almqvist, Ola Grimsholm, and Angelina I. Bernardi. 2010. "The pre-B Cell Receptor Checkpoint." *FEBS Letters* 584 (12) (June 18): 2572–2579. doi:10.1016/j.febslet.2010.04.057.
- Moins-Teisserenc, H T, S D Gadola, M Cella, P R Dunbar, A Exley, N Blake, C Baykal, et al. 1999. "Association of a Syndrome Resembling Wegener's Granulomatosis with Low Surface Expression of HLA class-I Molecules." *Lancet* 354 (9190) (November 6): 1598–1603.
- Moise, Ana, Filofteia Daniela Nedelcu, Maria Adela Toader, Steluta Mihaela Sora, Anca Tica, Denisa Elena Ferastraoaru, and Ileana Constantinescu. 2010. "Primary Immunodeficiencies of the B Lymphocyte." *Journal of Medicine and Life* 3 (1) (March): 60–63.
- Monroe, John, Gregory Bannish, Ezequiel Fuentes-Panana, Leslie King, Peter Sandel, James Chung, and Richard Sater. 2003. "Positive and Negative Selection During B Lymphocyte Development." *Immunologic Research* 27 (2) (June 1): 427–442. doi:10.1385/IR:27:2-3:427.
- Muramatsu, M, K Kinoshita, S Fagarasan, S Yamada, Y Shinkai, and T Honjo. 2000. "Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme." *Cell* 102 (5) (September 1): 553–563.
- Muramatsu, Masamichi, V. S Sankaranand, Shrikant Anant, Manabu Sugai, Kazuo Kinoshita, Nicholas O Davidson, and Tasuku Honjo. 1999. "Specific Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-Editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells." *Journal of Biological Chemistry* 274 (26) (June 25): 18470–18476. doi:10.1074/jbc.274.26.18470.
- Murre, Cornelis. 2009. "Developmental Trajectories in Early Hematopoiesis." *Genes & Development* 23 (20) (October 15): 2366–2370. doi:10.1101/gad.1861709.
- Nagata, S. 1996. "Fas-mediated Apoptosis." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 406: 119–124.
- Noguchi, Masayuki, Huafang Yi, Howard M. Rosenblatt, Alexandra H. Filipovich, Stephen Adelstein, William S. Modi, O.Wesley McBride, and Warren J. Leonard. 1993. "Interleukin-2 Receptor γ Chain Mutation Results in X-linked Severe Combined Immunodeficiency in Humans." *Cell* 73 (1) (April 9): 147–157. doi:10.1016/0092-8674(93)90167-O.
- Notarangelo, L D, S Giliani, P Mella, R F Schumacher, C Mazza, G Savoldi, C Rodriguez-Pérez, et al. 2000. "Combined Immunodeficiencies Due to Defects in Signal Transduction: Defects of the γ mac-JAK3 Signaling Pathway as a Model." *Immunobiology* 202 (2) (August): 106–119.
- Nutt, Stephen L., and Barbara L. Kee. 2007. "The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment." *Immunity* 26 (6) (June 22): 715–725. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.010.
- O'Driscoll, Mark, Karen M. Cerosaletti, Pierre-M Girard, Yan Dai, Markus Stumm, Boris Kysela, Betsy Hirsch, et al. 2001. "DNA Ligase IV Mutations Identified in Patients Exhibiting

- Developmental Delay and Immunodeficiency.” *Molecular Cell* 8 (6) (December): 1175–1185. doi:10.1016/S1097-2765(01)00408-7.
- Oettinger, M. A., D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. “RAG-1 and RAG-2, Adjacent Genes That Synergistically Activate V(D)J Recombination.” *Science* 248 (4962) (June 22): 1517–1523. doi:10.1126/science.2360047.
- Okazaki, Il-mi, Kazuo Kinoshita, Masamichi Muramatsu, Kiyotsugu Yoshikawa, and Tasuku Honjo. 2002. “The AID Enzyme Induces Class Switch Recombination in Fibroblasts.” *Nature* 416 (6878) (March 21): 340–345. doi:10.1038/nature727.
- Paus, Didrik, Tri Giang Phan, Tyani D Chan, Sandra Gardam, Antony Basten, and Robert Brink. 2006. “Antigen Recognition Strength Regulates the Choice Between Extrafollicular Plasma Cell and Germinal Center B Cell Differentiation.” *The Journal of Experimental Medicine* 203 (4) (April 17): 1081–1091. doi:10.1084/jem.20060087.
- Pelanda, Roberta, Uschi Braun, Elias Hobeika, Michel C Nussenzweig, and Michael Reth. 2002. “B Cell Progenitors Are Arrested in Maturation but Have Intact VDJ Recombination in the Absence of Ig-alpha and Ig-beta.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (2) (July 15): 865–872.
- Pennington, Daniel J, Bruno Silva-Santos, John Shires, Efsthios Theodoridis, Christopher Pollitt, Emma L Wise, Robert E Tigelaar, Michael J Owen, and Adrian C Hayday. 2003. “The Inter-relatedness and Interdependence of Mouse T Cell Receptor Gammadelta+ and Alphabeta+ Cells.” *Nature Immunology* 4 (10) (October): 991–998. doi:10.1038/ni979.
- de Préal, C, B Lisowska-Groszpiere, M Loche, C Griscelli, and B Mach. 1985. “A Trans-acting Class II Regulatory Gene Unlinked to the MHC Controls Expression of HLA Class II Genes.” *Nature* 318 (6043) (November 21): 291–293.
- Pui, John C, David Allman, Lanwei Xu, Susan DeRocco, Fredrick G Karnell, Sonia Bakkour, Julia Y Lee, et al. 1999. “Notch1 Expression in Early Lymphopoiesis Influences B Versus T Lineage Determination.” *Immunity* 11 (3) (September 1): 299–308. doi:10.1016/S1074-7613(00)80105-3.
- Qi, Hai, Jennifer L. Cannons, Frederick Klauschen, Pamela L. Schwartzberg, and Ronald N. Germain. 2008. “SAP-controlled T[B Cell Interactions Underlie Germinal Centre Formation.” *Nature* 455 (7214) (October 9): 764–769. doi:10.1038/nature07345.
- Radtke, Freddy, Anne Wilson, Gerlinde Stark, Michelle Bauer, Joost van Meerwijk, H. Robson MacDonald, and Michel Aguet. 1999. “Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1.” *Immunity* 10 (5) (May 1): 547–558. doi:10.1016/S1074-7613(00)80054-0.
- Reth, Michael. 1989. “Antigen Receptor Tail Clue.” *Nature* 338 (6214) (March 30): 383–384. doi:10.1038/338383b0.
- Rigaud, Stéphanie, Marie-Claude Fondanèche, Nathalie Lambert, Benoit Pasquier, Véronique Mateo, Pauline Soulas, Lionel Galicier, et al. 2006. “XIAP Deficiency in Humans Causes an X-linked Lymphoproliferative Syndrome.” *Nature* 444 (7115) (November 2): 110–114. doi:10.1038/nature05257.
- Sallusto, F, D Lenig, R Förster, M Lipp, and A Lanzavecchia. 1999. “Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions.” *Nature* 401 (6754) (October 14): 708–712. doi:10.1038/44385.
- Shapiro-Shelef, Miriam, and Kathryn Calame. 2005. “Regulation of Plasma-cell Development.” *Nature Reviews. Immunology* 5 (3) (March): 230–242. doi:10.1038/nri1572.
- Scholl, Paul R., and Raif S. Geha. 1994. “MHC Class II Signaling in B-cell Activation.” *Immunology Today* 15 (9) (September): 418–422. doi:10.1016/0167-5699(94)90271-2.
- Szabolcs, Paul, Marina Cavazzana-Calvo, Alain Fischer, and Paul Veys. 2010. “Bone Marrow Transplantation for Primary Immunodeficiency Diseases.” *Pediatric Clinics of North America* 57 (1) (February): 207–237. doi:10.1016/j.pcl.2009.12.004.
- Villa, Anna, Sandro Santagata, Fabio Bozzi, Silvia Giliani, Annalisa Frattini, Luisa Imberti, Luisa Benerini Gatta, et al. 1998. “Partial V(D)J Recombination Activity Leads to Omenn Syndrome.” *Cell* 93 (5) (May 29): 885–896. doi:10.1016/S0092-8674(00)81448-8.

- Villard, K. Masternak, B. Lisowska-Grospierre, A. Fischer, and W. Reith. 2001. "MHC Class II Deficiency: a Disease of Gene Regulation." *Medicine* 80 (6): 405–418.
- Villartay, Jean-Pierre de, Alain Fischer, and Anne Durandy. 2003. "The Mechanisms of Immune Diversification and Their Disorders." *Nature Reviews Immunology* 3 (12) (December 1): 962–972. doi:10.1038/nri1247.
- Washburn, Tracy, Edina Schweighoffer, Thomas Gridley, David Chang, B.J Fowlkes, Dragana Cado, and Ellen Robey. 1997. "Notch Activity Influences the A β Versus $\Gamma\delta$ T Cell Lineage Decision." *Cell* 88 (6) (March 21): 833–843. doi:10.1016/S0092-8674(00)81929-7.
- Yoshida, Taketoshi, Henrik Mei, Thomas Dörner, Falk Hiepe, Andreas Radbruch, Simon Fillatreau, and Bimba F Hoyer. 2010. "Memory B and Memory Plasma Cells." *Immunological Reviews* 237 (1) (September 1): 117–139. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00938.x.