

Universita Karlova v Praze, Lékařská Fakulta v Plzni

Šiklův patologicko anatomický ústav



**Imunopatologické a imunogenetické  
aspekty transplantací krvetvorných  
buněk a solidních orgánů**

MUDr. Pavel Jindra

Doktorská disertační práce

Plzeň 2011

Obor: patologie

Školitel: Doc. MUDr. Ludmila Boudová, PhD.

## **Předmluva**

Doktorská dizertační práce shrnuje publikační aktivitu autora v oblasti imunogenetiky imunopatologie transplantací krvetvorných buněk a solidních orgánů. Spis je členěn do tří částí.

První, nejobsáhlejší a základní část autorovy dizertační práce je prospektivní studie, která zkoumá repertoár jednotlivých genů KIR a diverzitu genotypů KIR u vysoce specifické populace selektované na podkladě uniformního HLA fenotypu i genotypu. Jedná se o soubor jedinců s HLA genotypem složeným z 2 ancestrálních HLA haplotypů AH8.1. (homozygotní genotyp AH8.1.). Práce analyzuje jednak frekvenci jednotlivých aktivačních a inhibičních KIR genů a jednak distribuci KIR genotypů v této unikátní, HLA uniformní populaci. Získaná data srovnává s běžnou, neselektovanou populací ČR a dále pak s populací indoevropskou (kavkazoidní). Zásadním zjištěním byl fakt, že KIR repertoár zůstává stejně pestrým bez ohledu na uniformitu HLA genotypu u studovaných jedinců a že na jeho evoluci se tedy pravděpodobně podílejí i jiné faktory než ty, které ovlivňují evoluci HLA systému. Prezentovaná data jsou celosvětově prioritní, nebyla dosud publikována a poskytují důkaz o vzájemně relativně nezávislé evoluci obou základních imunitních systémů, tedy KIR a HLA systému.

Druhá část dizertační práce shrnuje popisy nových, dosud nepopsaných alel HLA systému či genomických aberací HLA systému, jež byly v posledních letech poprvé identifikovány v HLA laboratoří Hematologicko-onkologického oddělení Českého Národního Registru Dárců Dřeně (ČNRDD) ve FN Plzeň, kterou autor zakládal a do současnosti i stále vede. Prioritní popsání těchto dosud neznámých HLA alel bylo umožněno zavedením HLA typizace přímou sekvenací příslušného HLA genu (SBT-sequence based typing), na které se autor podílel.

Třetí oddíl představuje souhrn dalších publikací v posledních 4 letech, na kterých se autor podílel a které souvisejí s tématem dizertační práce. Tato část demonstruje uplatnění molekulárně biologických metod ve všech oblastech transplantologie, moderní patologie i dalších odvětvích medicíny.

## **Poděkování**

Rád bych na tomto místě poděkoval své školitelce Prof. MUDr. Ludmile Boudové, PhD. za odborné vedení a cenné připomínky při vypracování této dizertační práce. Dále bych chtěl poděkovat všem kolegyním a kolegům z Hematologicko-onkologického oddělení v čele s primářem MUDr. Vladimírem Kozou za možnost podílet se na řešení zajímavých výzkumných projektů. Bez nich by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

## **Grantová podpora:**

Práce byla zčásti podpořena grantem IGA NR/9268-3)

## **Prohlášení autora**

Autor dizertační práce "**Imunopatologické a imunogenetické aspekty transplantací krvetvorných buněk a solidních orgánů**" souhlasí s jejím půjčováním dle zavedených pravidel.

V Plzni 15. 3. 2011

Pavel Jindra

## ABSTRAKT

KIR geny a jejich produkty- killer imunoglobulin-like receptory (KIR) na povrchu NK buněk (natural killers) jsou jedním z klíčových prvků vrozené imunity člověka. NK buňky jsou to rychle účinkující efektorové buňky, které primárně likvidují virem infikované a nádorové buňky. Tato schopnost destruovat cílové buňky je dána vzájemnou interakcí mezi KIR receptory a příslušnou specifickou HLA molekulou na povrchu buněk, neboli ligandem KIR receptorů. Genetická diverzita KIR genů a genotypů připomíná diverzitu HLA systému. Přestože jsou geny kódující KIR a HLA lokalizované na různých chromozomech a segregují se tedy nezávisle, existují určité důkazy alespoň částečné koevoluce obou systémů. Lze tudíž předpokládat. U HLA restrihované populace lze tedy očekávat alespoň částečnou redukci v diverzitě KIR genů i genotypů. Celkem 41 jedinců homozygotních v ancestrálním HLA haplotypu AH8.1 (HLA-A\*0101-Cw\*0701-B\*0801-DRB1\*0301-DQB1\*0201), bylo kompletně genotypizováno pro KIR geny. Celkově bylo zjištěno celkem 14 různých KIR genotypů, přičemž zaznamenaná frekvence výskytu KIR genů a kompozice KIR genotypů v podstatě odpovídala datům ze studií u neselektované (ve smyslu HLA) populace Kavkazanů („Caucasians“). Takzvané „non-framework“ KIR geny s frekvencí více než 90 % zahrnovaly KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DS4 a KIR2DP1. S výjimkou KIR2DS4 genu, všechny aktivační geny měly frekvenci výskytu nižší než 50 %. Geny s nejvzácnějším výskytem byly KIR2DS5 (17 %) u aktivačních genů a KIR2DL5 (37 %) u inhibičních. Pokud jde o KIR genotypy, tak bylo zjištěno celkem 14 různých genotypů, přičemž nečastějším byl AA genotyp zaznamenaný u 39 % jedinců. Celkem 22 jedinců (54 %) mělo kopii haplotypu A a B (AB genotyp), zatímco pouze 3 jedinci (7 %) byli homozygotní pro B haplotyp (BB genotyp). 9 ze 14 detekovaných genotypů se vyskytovaly pouze u 1 osoby. Srovnáním s dosud publikovanými a reportovanými genotypy ([www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net)) jsme zjistili, že 5 genotypů bylo reportováno celosvětově u méně než 20 individuí a jeden genotyp byl zaznamenaný dosud pouze u jedné osoby. Na druhé straně, 68 % detekovaných genotypů v souboru bylo představováno pouze jedním uniformním typem KIR genotypu (AA). Výsledky neprokazují žádnou alteraci KIR repertoáru ve analyzované skupině. Naopak, prokazují silně zachovanou a nerestrihovanou KIR diverzitu i v této HLA uniformní skupině osob.

## **SEZNAM ZKRATEK:**

AH8.1 – nejfrekventnější haplotyp indoevropské populace (ancestrální), obsahuje HLA antigeny A1-B8-DR3

CF – „carrier frequency“ - frekvence jedinců nesoucích daný znak

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

GF – „gene frequency“ = frekvence genů pro daný znak

HCT – Haematopoietic Cell Transplantation: Transplantace krvetvorných buněk.

HLA – Human Leucocyte Antigens: tkáňové znaky na povrchu bílých krvinek

KIR – Killer Immunoglobulin-like Receptors: receptory podobné imunoglobulinům na povrchu NK buněk

MHC – Major Histocompatibility Complex: Hlavní histokompatibilní komplex

NK - Natural Killers: buňky imunitního systému se schopností přímé likvidace cílových buněk

PCR-SSP – polymerázová řetězová reakce s využitím metodiky sekvenčně specifických primerů

## **OBSAH**

<b>1 Distribuce genů KIR v populaci nepříbuzných jedinců homozygotních pro ancestrální haplotyp AH8.1 (HLA-A1B8DR3)</b>	
<b>1.1 Úvod, vymezení pojmů a problematiky KIR a HLA.....7</b>	
<i>1.1.1 KIR – killer immunoglobulin-like receptor- definice, funkce</i>	
<i>1.1.2 Nomenklatura KIR</i>	
<i>1.1.3 KIR geny – přehled a jejich HLA ligandy</i>	
<i>1.1.4 Genomická organizace KIR genů</i>	
<i>1.1.5 Haplotypická variabilita KIR genů</i>	
<i>1.1.6 HLA systém – základní principy</i>	
1.1.6.1 Funkce HLA systému	
1.1.6.2 Funkční a strukturální rozdělení HLA antigenů	
1.1.6.3 HLA molekuly – genetická organizace a struktura	
1.1.6.4 Polymorfismus HLA	
1.1.6.5 Dědičnost HLA systému	
<i>1.1.7 KIR a HLA – vzájemná interakce, souhrn</i>	
<i>1.1.8 Teoretické východisko práce - populační genetika KIR v závislosti na HLA genotypu, možné implikace pro transplantace krvetvorných buněk.</i>	
1.1.8.1 Populační genetika KIR v závislosti na HLA genotypu	
1.1.8.2 Implikace pro transplantace krvetvorných buněk	
<b>1.2 Cíle práce.....25</b>	
<b>1.3 Materiál a metodika.....26</b>	
<i>1.3.1 Studovaná populace, výběr jedinců</i>	
<i>1.3.2 HLA typizace</i>	
<i>1.3.3 KIR genotypizace</i>	
<i>1.3.4 Stanovení a definice KIR genotypů, statistické zhodnocení</i>	
<b>1.4 Výsledky.....29</b>	
1.4.1 KIR geny	
1.4.2 KIR-HLA ligand kontext	
1.4.3 KIR genotypy	
<b>1.5 Diskuze.....36</b>	
<b>1.6 Závěr.....40</b>	
<b>1.7 Seznam použité literatury.....41</b>	
<b>1.8 Příloha: Manuskript publikace hlavní části disertační práce: Distribution of KIR genes in the population of unrelated individuals homozygous for ancestral haplotype AH8.1 (HLA-A1B8DR3). Jindra</b>	

P, Venigová P, Lysák D, Steinerova K, Koza V. Tissue Antigens. 2010 Sep; 76(3):240-4. **IF 2,33**

## **2 Publikované nové objevené alely či genomické aberace alel HLA systému .....46**

- 2.1** Venigová P, Jindra P, Koza V. Detection of a B-acute lymphoblastic leukemia blast-specific mutation in HLA-B\*39:01. Accepted for publication, Int J Immunogenetics **IF 1,522**
- 2.2** Karvunidis T, Jindra P, Fischer G, Venigova P, Dorner A, Koza V. Identification of a novel HLA-DRB1\*14 allele, HLA-DRB1\*1458, by sequence-based typing. Tissue Antigens. 2007 Oct; 70(4):348-9. **IF 2,33**
- 2.3** Horn PA, DeLuca DS, Jindra P, Blasczyk R. The replacement mutation in HLA-DRB1\*1211 affects a likely keystone position. Hum Immunol. 2005 Dec; 66 (12):1254-7. **IF 2,550**

## **3 Výběr z dalších publikací s problematikou imunopatologie transplantací krvetvorných buněk a solidních orgánů od r. 2007.....50**

- 3.1** Lysák D, Kořístek Z, Gašová Z, Skoumalová I, Jindra P. Efficacy and safety of peripheral blood stem cell collection in elderly donors: does age interfere? J Clin Apher 2010 epub ahead of print **IF 1,682**
- 3.2** Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Faber E, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Association of IL6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2009 Aug;44(4): 227-35 **IF 2,998**
- 3.3** Little AM, Jindra P, Raffoux C. Strategies for new donor typing based on donor HLA type or donor characteristics. Tissue Antigens. 2007 Apr; 69 Suppl 1:8-9. Review. **IF 2,33**
- 3.4** Reischig T, Jindra P, Svecová M, Kormunda S, Opatrný K Jr, Treska V. The impact of cytomegalovirus disease and asymptomatic infection on acute renal allograft rejection. J Clin Virol. 2006 Jun; 36(2):146-51. **IF 3,124**

## **4 Souhrn dalších publikací autora v impaktovaných či recenzovaných časopisech od r. 2000.....55**

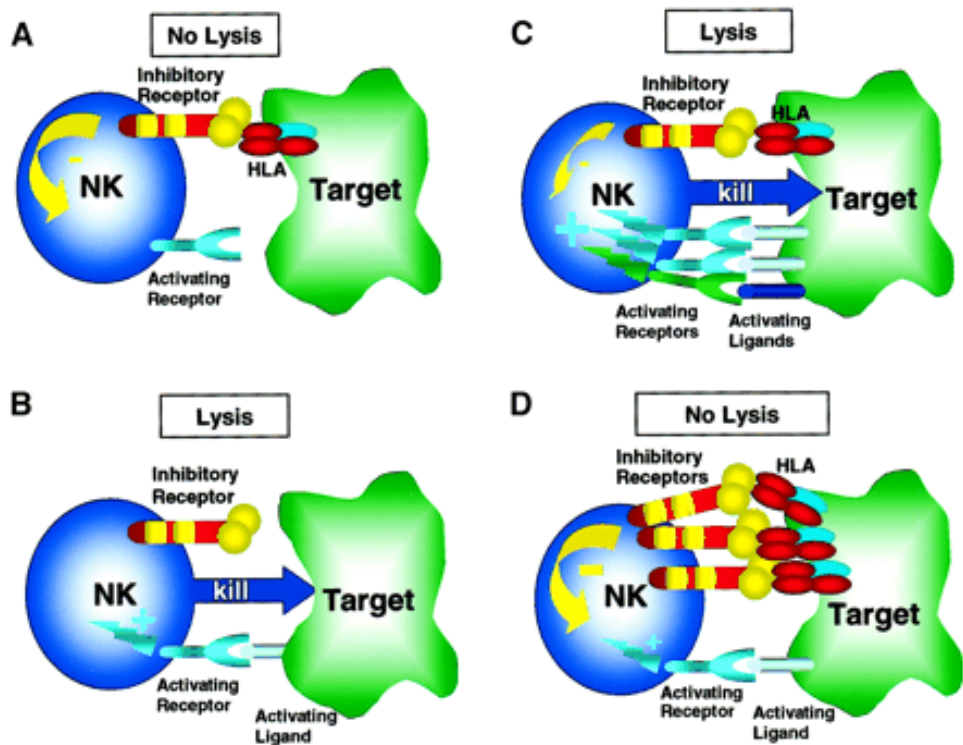
# 1 Distribuce genů KIR v populaci nepříbuzných jedinců homozygotních pro ancestrální haplotyp AH8.1 (HLA-A1B8DR3)

## 1.1 Úvod, vymezení pojmů a problematiky KIR a HLA

### 1.1.1 KIR – killer immunoglobulin-like receptor- definice, funkce

KIR, jinak akronymum slov Killer Immunoglobulin-like Receptors, jsou receptory na povrchu NK (natural killers) buněk. NK buněk jsou podskupinou periferních lymfocytů, které mají unikátní funkci ve vrozené imunitní odpovědi. Jsou to rychle účinkující efektorové buňky, které primárně likvidují především buňky infikované virem a nádorové buňky (1). Na rozdíl od B- a T- lymfocytů však NK buňky nepřeskupují geny kódující receptory pro rozpoznání antigenů, ale rozvinuly schopnost rozpoznat molekuly vlastního MHC systému (Major Histocompatibility Complex, viz kapitola 1.1.6), jmenovitě HLA I. třídy. Ty rozpoznávají prostřednictvím unikátních receptorů, které mohou inhibovat anebo naopak aktivovat NK buňky k „zabíjení“ (2). Tato schopnost destruovat cílové buňky je právě dána vzájemnou interakcí mezi KIR receptory a příslušnou specifickou HLA molekulou na povrchu buněk, neboli ligandem KIR receptorů. Zjednodušený princip interakce mezi oběma typy KIR receptorů a HLA molekulou na povrchu cílové buňky ukazuje obrázek 1 (3).

Pokud to můžeme principálně zjednodušit, pak NK buňky neustále systematicky „zkoumají“ přítomnost či absenci příslušných HLA ligand pro své KIR receptory. Pokud je příslušný HLA ligand (HLA molekula) přítomen, pak dojde k vazbě KIR-ligand HLA a jelikož za normálních okolností vždy inhibiční KIR převládají nad aktivačními, nedochází ke spuštění cytotoxické reakce NK buněk a takto jsou „vlastní“ buňky chráněny před cytotoxicitou (viz část A a především D na obr. 1). Pokud receptory KIR nenaleznou příslušný ligand HLA („vlastní“ molekulu HLA), nemůže být cytotoxicita příslušné NK buňky prostřednictvím inhibičních receptorů KIR a náležitá cytotoxická kaskáda je spuštěna (viz část B na obr. 1).



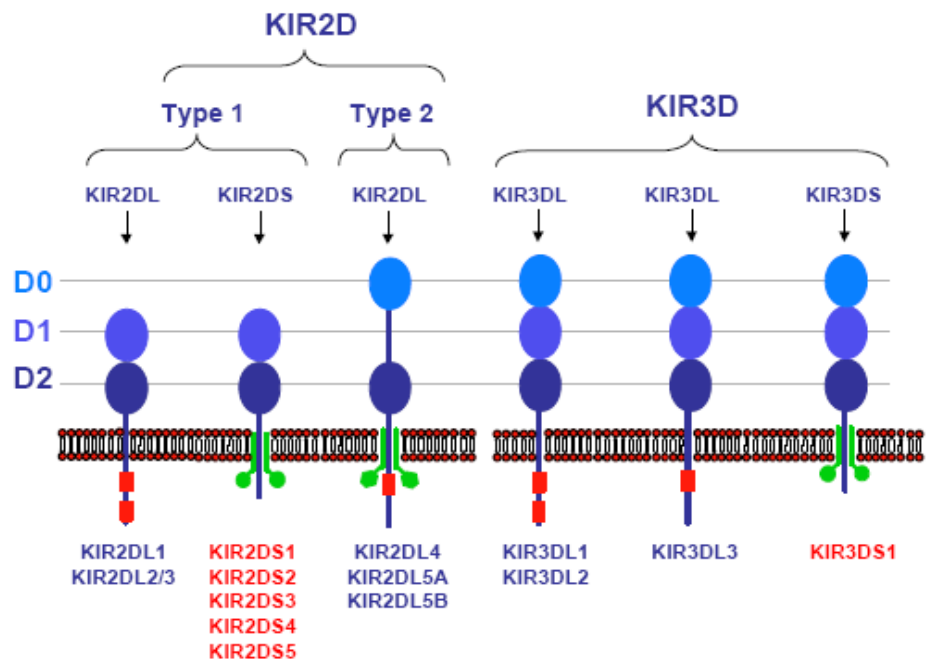
Obrázek 1: Regulace odpovědi NK buňky prostřednictvím interakce aktivačních/inhibičních KIR receptorů a HLA molekuly. Za normálních okolností inhibiční signál vždy převládá nad aktivačním. Převzato z Farag et al., Blood 2002, 100: st. 1937

Lze-li stručně shrnout, pak NK buňky s potenciálem iniciovat cytotoxickou aloreakci používají KIRy jako inhibiční směrem k „vlastním“, zdravým buňkám. Pokud však příslušný vlastní ligand HLA na cílové buňce chybí, pak je iniciována cytotoxická reakce. Celý tento koncept interakce KIR/HLA a mechanismus regulace cytotoxicity NK buněk se nazývá „missing-self“ hypotéza (3). Tím je zaručena tolerance NK buněk k „vlastním“ a zdravým buňkám, naopak alogenní („cizí“) buňky, či buňky s „down“- regulovanou HLA molekulou (ligandem), což jsou typicky buňky nádorové či buňky napadené virem, jsou efektivně eliminovány (1-4).



### 1.1.2 Nomenklatura KIR

Nomenklatura genů KIR a receptorů vychází ze struktury molekuly jejich produktu, respektive z počtu „Ig-like“ domén a délky cytoplasmatického výběžku (tail) – viz obraz 2.



Obr. 2: Nomenklatura KIR genů/receptorů (převzato z [www.ebi.ac.uk/lpd/kir](http://www.ebi.ac.uk/lpd/kir))

Stručně, KIR receptory mají buď 2 nebo 3 imunoglobulinové domény (2D nebo 3D) a buď dlouhý (long-L) nebo krátký (short- S) cytoplasmatický „ocásek“ (tail). Kombinací počtu těchto Ig-like domén a přítomnosti S nebo L cytoplasmatické části je generován název KIR genu/receptoru (5,6).

### 1.1.3 KIR geny – přehled a jejich HLA ligandy

Celkem bylo popsáno 15 exprimovaných KIR genů a 2 KIR pseudogeny. Přehled všech KIR genů/receptorů a jejich funkcí je uveden v tabulce 1.

KIR gen	Funkce – typ signálu	HLA ligand
2DL1	Inhibiční	HLA-C2
2DL2	Inhibiční	HLA-C1
2DL3	Inhibiční	HLA-C1
2DL4	Aktivační	HLA-G
2DL5A	Inhibiční	Není znám
2DL5B	Inhibiční	Není znám
3DL1	Inhibiční	HLA-Bw4
3DL2	Inhibiční	HLA-A3,A11
3DL3	Není známo	Není znám
2DS1	Aktivační	HLA-C2
2DS2	Aktivační	HLA-C1
2DS3	Aktivační	Není znám
2DS4	Aktivační	Není znám
2DS5	Aktivační	Není znám
3DS1	Aktivační	HLA-Bw4?
2DP1, 3DP1	Pseudogeny, neexprimovány	

Tabulka 1: KIR geny&receptory jejich vazební partneři (ligandy)

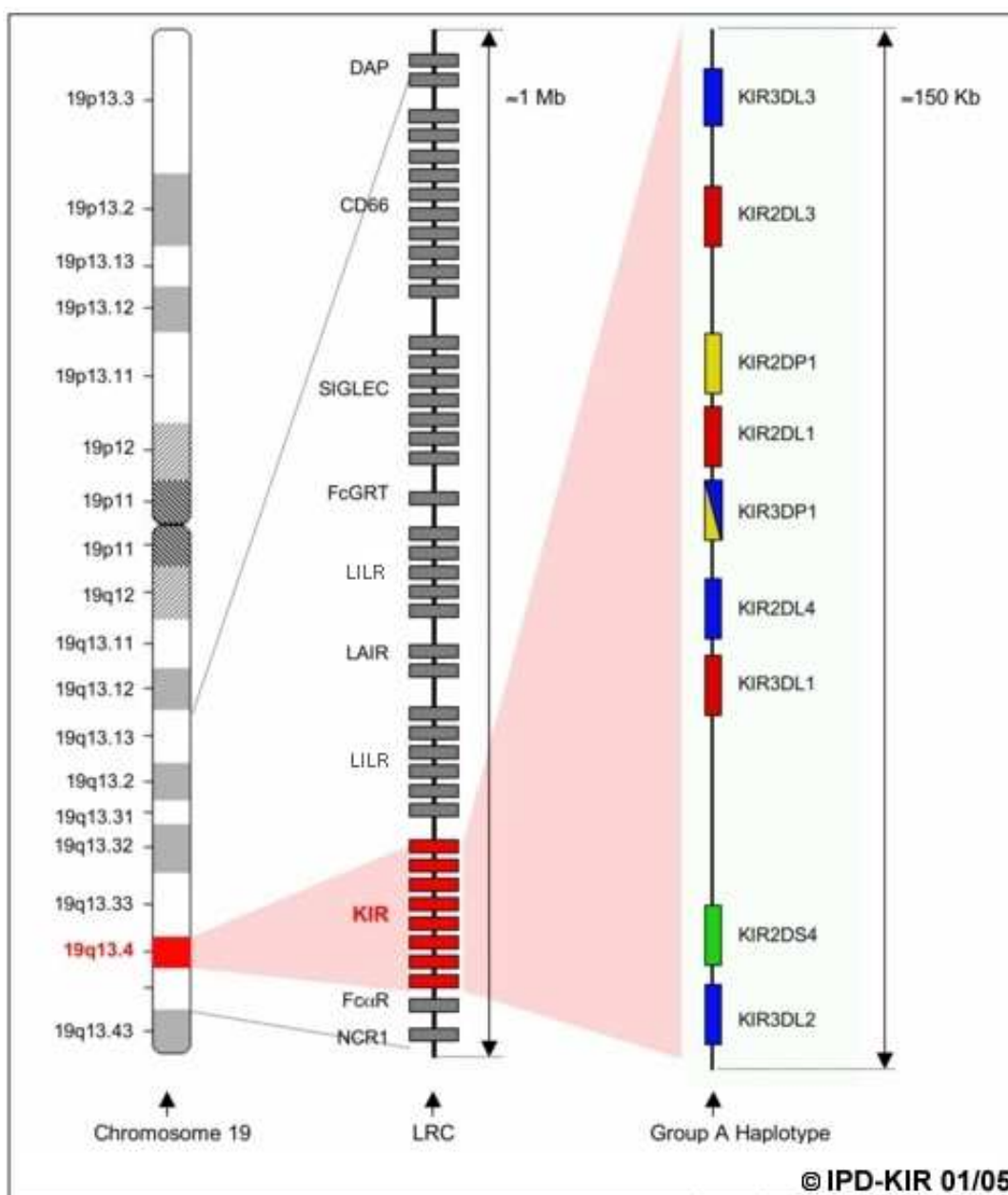
Jak je z tabulky patrné, s jedinou výjimkou (KIR2DL4) jsou všechny KIR s krátkým cytoplasmatickým výběžkem („S“) aktivační a naopak „L“ receptory inhibičními.

Pokud jde o vazební partnery KIR (jejich ligandy), pak tyto jsou známy především pro inhibiční receptory a ve všech případech jde o HLA specifický I. třídy. Jedná se především o skupinu alel HLA-C alel lišících se aminokyselinovým reziduem na pozicích 77 a 80  $\alpha$  – helixu molekuly HLA-C (7). Byla publikována rozsáhlá data ukazující

na význam inhibičních KIR a jejich HLA ligand pro výsledek transplantace krvetvorných buněk (viz dále).

### 1.1.4 Genomická organizace KIR genů

Všechny geny KIR jsou lokalizovány na chromosomu 19q13.4 v oblasti zvané „leukocyte receptor complex“ (LRC). Pro každý KIR gen navíc existují alelické varianty (9,10). Podobně jako geny HLA systému se i KIR geny dědí jako celý blok genů – haplotyp (viz obr. 3).



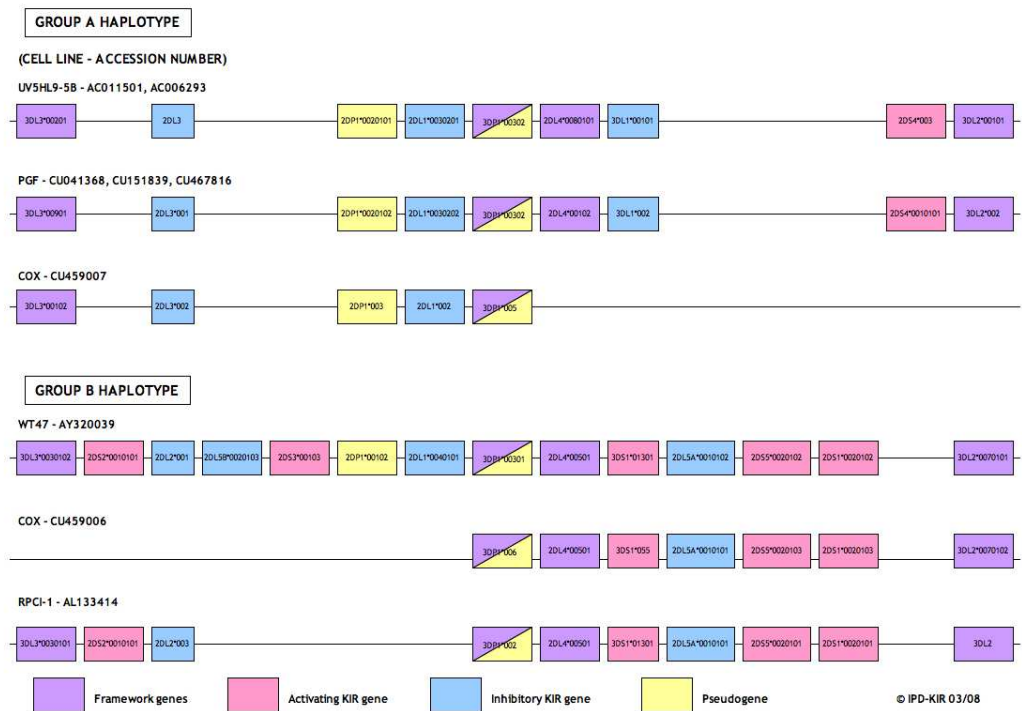
Obrázek 3: Genomická organizace KIR genů (převzato z Robinson et al., 8)

### 1.1.5 Haplotypická variabilita KIR genů

Kromě alelického polymorfismu existuje pro KIR geny ještě výrazná haplotypická variabilita. Ta je způsobena variabilitou v počtu a v typu zastoupených KIR genů na daném haplotypu (9,10). Právě tato haplotypická diverzita je hlavním důvodem populační diverzity KIR genů a repertoáru NK buněk. Na základě typické kompozice KIR genů jsou rozlišovány **2 základní typy KIR haplotypů, které jsou označovány A a B**. V současnosti není k dispozici žádné jednoduché univerzální kritérium definující a odlišující tyto haplotypy, používá se následující pracovní definice.

**Skupina haplotypů B** je charakterizována přítomností alespoň jednoho (či více) těchto genů: *KIR2DL5*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS5* a *KIR3DS1*. **Skupina haplotypů A** je pak tedy logicky charakterizována absencí těchto genů. V důsledku toho mají haplotypy B vždy více aktivačních KIR než haplotypy A (ty mohou mít pouze gen *KIR2DS4*). Bohužel nadále není jednoznačný konsensus v definici haplotypů A a B (10,11), takže různými autory jsou používána odlišná kritéria k definici haplotypů a to komplikuje srovnání a interpretaci různých studií v oblasti populační genetiky KIR genů. Schematický přehled základních KIR haplotypů ukazuje obrázek 4. Přestože tzv. „framework“ KIR geny (2DL4, 3DL2 A 3DL3, viz obr. 4) jsou přítomny prakticky u všech dosud typizovaných individuí, přítomnost ostatních 14 KIR genů je výrazně variabilní. Tato variabilita v zastoupení je větší pro aktivační KIR geny („S“), které mají navíc limitovaný alelický polymorfismus. Oproti tomu inhibiční geny jsou obvykle vždy v genotypu přítomné, ale mají zase extenzivní alelický polymorfismus. V současnosti již bylo popsáno několik desítek KIR haplotypů a na základě toho více než 300 rezultujících KIR genotypů (viz [www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net), 13), přičemž nové jsou neustále popisovány. Proto je pocítována nezbytnost zavedení robustního a praktického systému, který by definoval obsah genů různých KIR haplotypů. Bylo navrženo, aby každý KIR haplotyp byl označen „KH“ s následnou pomlčkou a poté unikátním

trojmístným číslem, dávaným postupně jednotlivým haplotypům. Tento systém umožňuje pojmenovat 999 haplotypů, ale stále čeká na oficiální implementaci.



Obrázek 4: Příklad typických KIR haplotypů skupiny A a skupiny B, převzato z [www.ebi.ac.uk/ipd/KIR](http://www.ebi.ac.uk/ipd/KIR) (8)

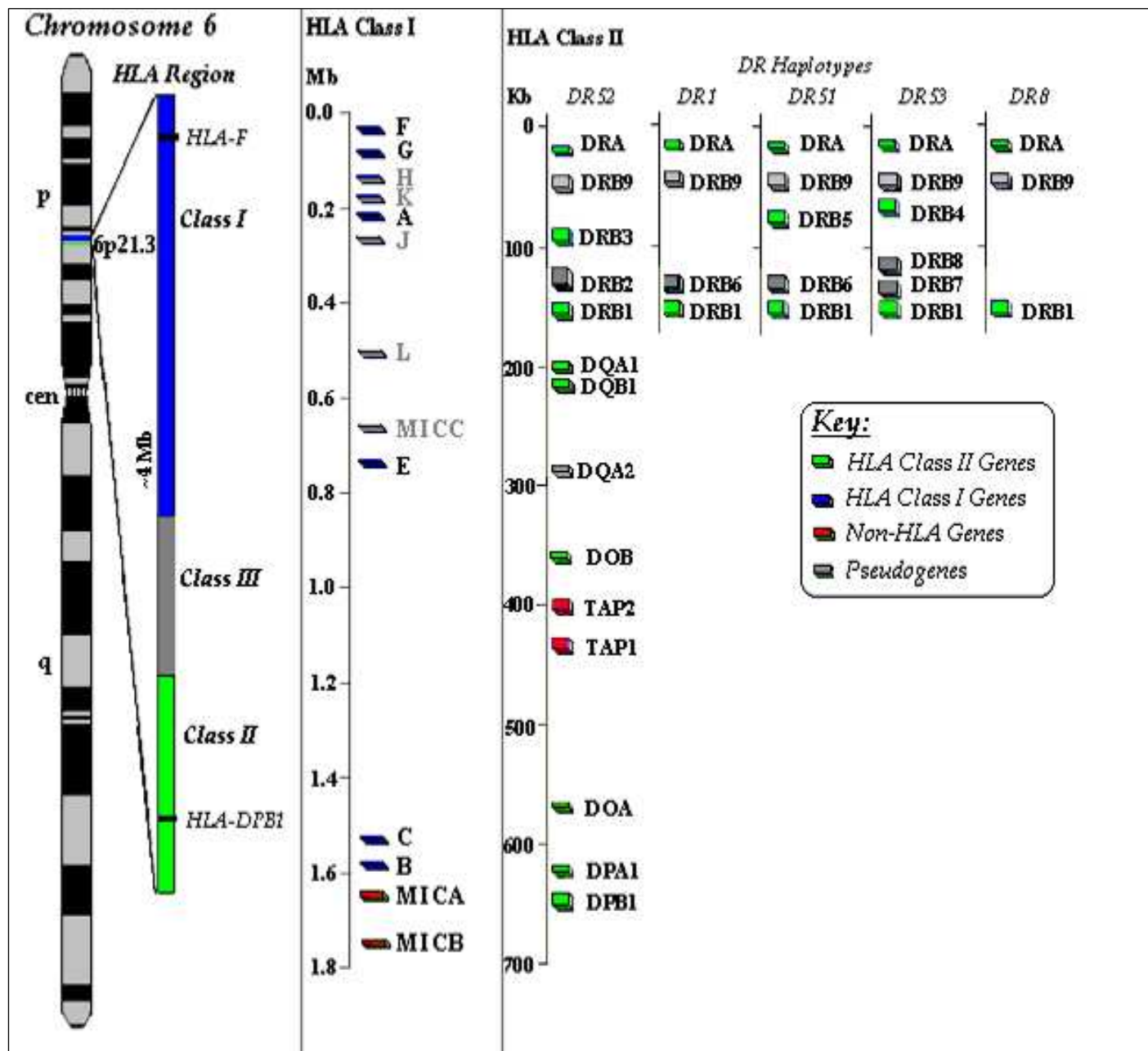
### **1.1.6 HLA systém – základní principy**

#### **1.1.6.1 Funkce HLA systému**

HLA antigeny jsou skupinou bílkovin s klíčovou úlohou v imunitním systému, které jsou lokalizovány jako „antigeny“ na povrchu buněk. Jsou to polypeptidové produkty skupiny genů nazývaných „hlavní histokompatibilní komplex“ (MHC – major histocompatibility complex). Tyto geny a aloreaktivita jimi podmíněná byly dosud popsány pouze u obratlovců. Uvnitř každého druhu obratlovců se pak geny tohoto komplexu nazývají „druhově“ specifickým jménem. U lidí je tak obvykle označujeme jako geny HLA (Human Leukocyte Antigen) systému a tento „druhově“ specifický název produktů genů MHC je uplatňován i u dalších druhů (u psů se například analogicky nazývá DLA – Dog Leukocyte Antigen apod.). Z funkčního i biologického hlediska jde však u všech savců o stále stejnou skupinu genů. Nutno podotknout, že termíny HLA a MHC se často používají synonymně a celkově nekonzistentně. V současnosti je doporučováno termínem HLA systém označovat pouze geny přímo kódující antigen-prezentující HLA molekuly a termínem MHC celý komplex regionu, který obsahuje kromě „klasických“ HLA genů i celou řadu dalších genů (např TAP1,2, MICA apod.) podílejících se též na aloreaktivní odpovědi, ale s méně významnou, často dosud neúplně prozkoumanou funkcí (viz obr. 5).

Velice zjednodušeně řečeno lze říci, že HLA molekuly jsou spolu s imunoglobuliny a receptory T-lymfocytů (TCR-T-cell receptors) základem adaptivní imunity člověka. Jejich fundamentální funkce v antigen-specifické imunitní odpovědi spočívá v tom, že T-lymfocyty jako klíčová regulační a efektorová složka imunitního systému jsou schopny poznávat a reagovat na antigenní fragmenty pouze v kontextu HLA molekul – tedy jsou-li tyto antigeny navázané na molekuly HLA systému (HLA restrihované rozpoznávání antigenů). Pouze molekuly HLA systému (I. a II. třída) na povrchu buněk mohou tedy intracelulárně „zpracované“ antigenní peptidy prezentovat T-

lymfocytům a tak zprostředkovávat imunitní reakci, která je výlučně zprostředkována systémem HLA . Strukturální bázi pro interakci mezi buňkou nesoucí molekulu HLA a T-lymfocytem je poměrně složitý komplex HLA molekuly, T-lymfocytárního receptoru (TCR) a antigenního peptidu (14).



Obrázek 5: Genomická organizace genů HLA systému (převzato z Robinson et al., 8)

#### 1.1.6.2 Funkční a strukturální rozdělení HLA antigenů

Z hlediska strukturálního a funkčního lze geny a molekuly (antigeny) HLA rozdělit do 2 základních skupin: HLA (anti)geny I. a II. třídy. Funkční hledisko je dané rozdíly ve zpracování a prezentaci antigenů imunokompetentním buňkám (především T-lymfocytům). Zatímco CD4+ T-lymfocyty (T-helpery) poznají zpracovaný antigen pouze v kontextu molekuly HLA II. třídy, CD8+, tedy cytotoxické T-lymfocyty, vyžadují prezentaci antigenu HLA molekulami I. třídy. Většinu antigenů prezentovaných molekulami I. třídy tvoří intracelulárně syntetizované antigeny, například vlastní či virové proteiny. V kontrastu s tím, molekuly HLA II. třídy prezentují peptidy, které byly získány proteolytickým štěpením fagocytovaných (tedy extracelulárních) proteinových antigenů, např. bakteriálních antigenů. Další rozdíl je v expresi, kdy molekuly I. třídy jsou přítomny prakticky na všech buňkách, přestože s různou expresí v různých tkáních (s největší denzitou na buňkách imunitního systému), zatímco exprese molekul II. třídy je omezena pouze na povrch B-lymfocytů, aktivovaných T-lymfocytů (na klidových T-lymfocytech je jejich exprese nízká), antigen-prezentujících buněk (APC) a dendritických buněk (15).

#### 1.1.6.3 HLA molekuly - genetická organizace a struktura

HLA systém je polygenní a velmi polymorfní (16). Celý komplex genů kódující (nejen) výše uvedené HLA bílkoviny je lokalizován na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21.1-6p21.3), v oblasti s největší hustotou genů v celém genomu (~3500 kbp). Je složen ze 3 základních regionů (viz obr. 5) o celkovém obsahu asi 140 genů. Nejbližše centromery je region II. třídy, který obsahuje geny pro  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce molekul HLA II. třídy a naopak nejbližše telomery je region I. třídy, který obsahuje geny pro těžké  $\alpha$  řetězce molekul HLA I. třídy. Mezi těmito 2 regiony se nachází region III (někdy označován jako region HLA III. třídy) s geny pro komplement (C4), některé cytokiny (TNF $\alpha$ ) a stresové proteiny (hsp). Zatímco



prakticky všechny geny regionu II se nějakým způsobem podílí na základní funkci HLA systému - tj. zpracování a prezentaci antigenů T-lymfocytům, z genů regionu III žádný a region třídy I je v tomto směru intermediární, tj. obsahuje směs genů jak bezprostředně se podílejících, tak přímo nesouvisejících s funkcí HLA systému.

➤ Geny regionu I, HLA I. třídy:

Tento region obsahuje přibližně 20 genů, z nichž nejdůležitějšími jsou geny HLA- A, -B a -C. Jsou nazývané klasickými geny HLA I. třídy, protože kódují těžké  $\alpha$  - řetězce molekul HLA I. třídy (viz výše), které jsou klasickými sérologickými specificitami I. třídy a prezentují antigenní fragmenty CD8+ T-lymfocytům. Dalšími geny jsou HLA E, F, G, MICA a MICB (někdy nazývaného „neklasické“) s úlohou především v přirozené cytotoxicitě (NK buňky), slizniční a reprodukční imunitě. Další geny – HLA H, J, K a MICC- jsou pseudogeny. Geny HLA-A, -B,-C jsou někdy též označovány jako „major“ MHC geny regionu a geny E, G a G jako „minor“.

➤ Geny regionu II, HLA třídy II:

Oblast regionu II (třídy II. HLA ) obsahuje jednak poměrně složitý komplex 3 párů genů kódující dimér HLA molekul II. třídy („major“ MHC II. proteiny), někdy zjednodušeně označovaný jako HLA DR, HLA DP a HLA DQ. Dále obsahuje geny kódující další glykoproteiny (DM, DO) s funkcí ve zpracování a prezentaci antigenů („minor“ geny – DOA,DOB).

Mezi typy DR a DQ proteinů existuje silná vazebná nerovnováha.

#### 1.1.6.4 Polymorfismus HLA

MHC lokusy obecně jsou geneticky nejvariabilnějšími kódujícími lokusy u savců a lidské HLA lokusy nejsou výjimkou. Evoluce MHC polymorfismu je způsobena 2 primárními selekčními tlaky: 1) selekcí ve prospěch MHC heterozygotů a 2) selekcí ve prospěch vzácných HLA alel prostřednictvím koevoluce hostitele-patogenu (host-pathogen coevolution) (14,15). Typickým rysem

HLA komplexu je absence „wild“ typu. Většina z hlavních lokusů (genů) HLA zmíněných výše obsahuje desítky až stovky alel. K 1.7. 2010 bylo popsáno celkem 5302 HLA alel (viz [www.hla.alleles.org/alleles/index.html](http://www.hla.alleles.org/alleles/index.html)), přičemž každý měsíc jsou popisovány desítky nových alel! Nejpolymorfnějším genem je HLA-B\* s takřka 2000 známými alelami, dále pak HLA-A a HLA-DRB1 s cca 1000 alelami. Pro podrobnější a aktuální statistiku odkazují na adresu [www.hla.alleles.org](http://www.hla.alleles.org). Většina variací aminokyselin daných polymorfismem HLA genů je koncentrována v oblastech genů kódujícím aminokyseliny vazebného žlábků HLA molekuly pro antigenní peptid, zatímco úseky HLA genů kódující část molekuly reagující s TCR receptorem jsou relativně konzervované. Tímto je zaručena pravděpodobnost úspěšné prezentace jakéhokoliv antigenního podnětu alespoň některými jedinci dané populace a je tak zajištěna imunologická reaktivita daného živočišného druhu jako celku.

Polymorfismus HLA genů v místě pro prezentaci antigenů se vyvinul jednak postupnou akumulací bodových mutací u potomků a jednak genovou konverzí a rekombinacemi. Pro ohromnou diverzitu HLA genů jsou rozhodujícím činitelem především genové konverze a rekombinace, což má důsledky pro jejich polymorfickou strukturu. Podíváme-li se podrobně na sekvence různých alel daného HLA genu, pak je zjevné, že alelická diverzita není dána pro alelu specifickou bodovou mutací, ale především různou kombinací sekvenčních motivů z jakéhosi základního „poolu“ různých sekvenčních motivů. Tato mozaikovitá struktura alelických sekvencí je v souladu s tím, že polymorfismus je generován především výměnami celých sekvenčních segmentů (17). Jednotlivé alely pak mohou být logicky považovány za jakési chiméry složené z různých segmentů ostatních alel, což potvrzuje i fakt, že nově identifikované alely jsou většinou charakterizovány novou kombinací již známých a popsaných sekvenčních motivů. S určitým zjednodušením lze tedy říci, že celkový počet alel

daného lokusu je především určen počtem teoreticky možných kombinací známých sekvenčních motivů genu.

Pokud jde o jednotlivé HLA lokusy, pak pro HLA geny I. třídy je polymorfismus lokalizován především v exonech 2 a 3, zatímco u HLA genů II. třídy je omezen takřka výhradně na exon 2 genu.

#### **1.1.6.5 Dědičnost HLA systému**

Z hlediska dědičnosti jsou všechny geny kódující HLA molekuly kodominantní a řídí se mendelovským typem dědičnosti. Všechny geny HLA systému na 6. chromozómu se dědí vcelku jako blok – takzvaný haplotyp. Jedinci jsou heterozygotní a mají tak na buňkách dvě kompletní sady HLA antigenů.

Geny HLA systému vykazují poměrně těsnou genetickou vazbu takže se většinou přenášejí jako bloky genů, mezi kterými pouze výjimečně dochází k rekombinaci (crossing-over). Rodinné studie ukázaly, že pro některé regiony uvnitř HLA komplexu je relativní absence rekombinací („crossing-over“) obzvláště typická. Jde především o subregiony HLA-B k HLA-C a HLA-DQB1 k HLA-DRB1. Tyto regiony jsou někdy označovány jako „polymorfní zmražené bloky“ a jejich odolnost vůči rekombinacím je základem vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium) – tedy nenáhodné asociaci alel 2 nebo více lokusů- mezi specifickými alelami HLA-B a HLA-C, respektive HLA-DR a DQ.

Populačně genetické studie prokázaly, že vazebná nerovnováha je dokonce typickým rysem HLA systému. Mezi pravděpodobné příčiny patří již uváděná redukováná frekvence rekombinací a selekce ve prospěch vázaného polymorfismu (18), podrobnější rozbor by byl nad rámec textu. Ukázkovým příkladem této vazebné nerovnováhy je nejčastější indoevropský („kavkazoidní“) haplotyp A1-B8-DR3, který se v bělošské populaci vykytuje až s 5-10% frekvencí a někdy je nazýván **ancestrálním haplotytem AH8.1** (viz též dále 1.1.8).

### **1.1.7 KIR a HLA – vzájemné interakce, souhrn**

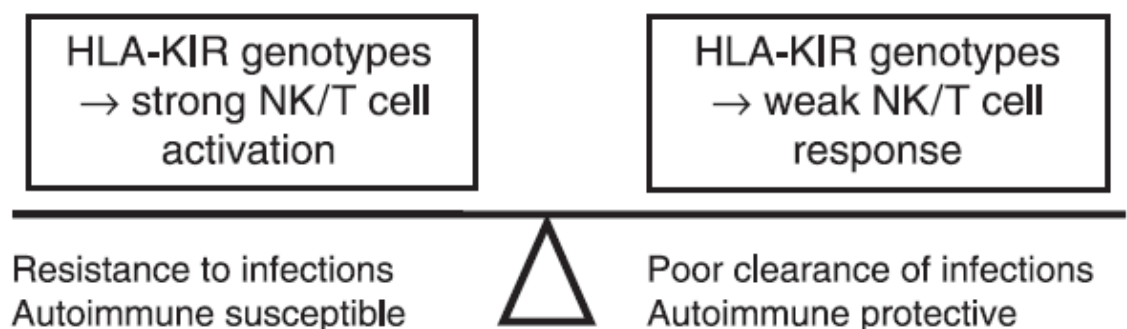
Jak je z výše uvedeného textu patrné, KIR a HLA molekuly společně modulují vrozenou a získanou (adaptivní) imunitu tím, že vzájemnou interakcí kontrolují efektorové buňky. Oba systémy mají řadu společných rysů: jsou kódovány v genomických regionech s velmi komplexní organizací a oba vykazují mimořádnou diverzitu jak uvnitř, tak mezi jednotlivými lidskými populacemi. Tato diverzita vznikla jako důsledek nepřetržité snahy účinně eliminovat neustále se měnící spektrum patogenů. Zatímco pro efektorové buňky získané imunity (čili B a T lymfocyty) je požadované variability imunitní odpovědi dosaženo somatickou přestavbou genomické DNA a selekcí náležitě reagujících buněk, pro KIR a HLA molekuly je funkční variabilita zajištěna přímo jejich značným genetickým polymorfismem. KIR geny navíc oproti HLA ještě mají značnou variabilitu v obsahu genů daného haplotypu. Klíčová a kritická role NK buněk ve vrozené imunitní „surveillance“ organismu (viz kapitola 1.1.1) implikuje možnost, že by patogeny mohly být pro KIR geny nositeli podobného typu selektivního tlaku, který u HLA systému rezultuje v univerzální a komplexní genetickou diverzitu (19,20). Také srovnatelná rychlost evoluce KIR poskytuje další důkaz pro selekci, která je primárně ovlivňována zevně působícími patogeny (21). Přestože jsou oba systémy - KIR a HLA - kódovány odlišnými chromozomy a jsou tedy segregovány i děděny nezávisle, zdá se dokonce, že alespoň některé KIR mají společnou evoluci s HLA (22). To podporuje hypotézu, že stejný princip selektivního tlaku a demografických faktorů, který ovlivňuje populační frekvenci výskytu alel HLA I. třídy, je zodpovědný i za evoluci KIR repertoáru neboť takto příslušným NK receptorům usnadňuje interakci s HLA molekulami I. třídy (23). Byla dokonce doložena i silná negativní korelace mezi přítomností aktivačních KIR a jejich HLA ligand v různých populacích což je dalším nepřímým důkazem určité vzájemné ko-evoluce KIR a HLA (22). Podobně byla pozorována signifikantní korelace mezi frekvencí

genotypů obsahujícími KIR2DL2 a 2DL3 a frekvencí jejich ligand – HLA C1 (24). Kumuluje se tak stále více dat ukazujících na význam určitých specifických KIR-HLA kombinací v patogenezi autoimunitních onemocnění, nádorových infekcí i průběhu určitých virových infekcí (25).

Jednoznačné interpretaci a porozumění úlohy interakce KIR-HLA v těchto patologických stavech však dosud brání mnoho faktorů – především extenzivní polymorfismus HLA a KIR a dále silná vazebná nerovnováha mezi variantami obou rodin genů. Přesto se zdá, že na základě dosavadních znalostí je možné učinit tyto obecné závěry:

1. KIR – HLA kombinace s převládající tendencí k aktivaci NK buněk nebo s nižší inhibiční úrovní jsou asociované se zvýšeným rizikem autoimunitních nemocí, ale naopak mají výraznější úroveň protektivity proti infekčním onemocněním.
2. HLA-KIR kombinace s převládajícím inhibičním potenciálem mají naopak protektivní vliv proti chronickým zánětlivým onemocněním a poruchám gestace

Tuto současnou představu shrnuje obrázek 6 (26).



Obrázek 6: Synergie mezi kompozicí KIR-HLA genotypů a výslednou dualitou mezi tendencí k autoimunitnímu či infekčnímu onemocnění. Různé KIR-HLA kombinace vyvolávají různou úroveň aktivace/inhibice NK a T buněk což má za následek odlišnou náchylnost k autoimunitnímu onemocnění a naopak protektivitu vůči infekčním onemocněním. Převzato z Traherne et al. (26).

### **1.1.8 Teoretické východisko práce - populační genetika KIR v závislosti na HLA genotypu, možné implikace pro transplantace krvetvorných buněk.**

Z výše uvedeného textu je zřejmé, že funkční různorodost přirozené imunitní odpovědi, která je kontrolována KIR/HLA interakcí, je geneticky determinovaná a udržovaná přírodní selekcí. Dále, že přes lokalizaci na různých chromozomech a následnou nezávislou segregaci je velmi pravděpodobná interakce mezi KIR a HLA polymorfismy (20-25). Nicméně veškerá dosud publikovaná data, podporující tuto hypotézu (viz výše), jsou nepřímá a víceméně spekulativní.

#### **1.1.8.1 Populační genetika KIR v závislosti na HLA genotypu**

Byla publikována řada studií analyzujících diverzitu KIR genů a genotypů v různých populacích (27-29), a to včetně české (30). Nicméně podle našich nejlepších vědomostí nebyla dosud publikována žádná studie, která by analyzovala diverzitu genotypů a tedy i repertoár genů KIR u nejfrekventnějšího MHC haplotypu indoevropské (kavkazoidní) populace – tedy A1-B8-C7-DR3-DQ2 (označovaný také termínem AH 8.1, nebo ancestrální haplotyp, viz též 1.1.6.5). Spolu s druhým ancestrálním haplotypem HLA-A3-B7-DR15-DQ6 se u indoevropanů oba dva vyskytují s frekvencí až 10 %, což je zřetelně více, než by bylo možné očekávat na základě pouhé frekvence jednotlivých HLA alel na těchto haplotypech (< 0,5 %). Zdá se pravděpodobné, že jejich prevalence je záležitostí relativně nedávné expanze. Je odhadováno, že haplotyp AH8.1 se oddělil od společného jednotlivého předchůdce přibližně před 23-24 000 lety (31), a to z důvodu nedávné expanze tohoto haplotypu.

Je na místě otázka, zdali stejné zevní faktory, které vedly k expanzi a selekci specifického uniformního HLA haplotypu (příkladem nechť jsou výše zmíněné ancestrální haplotypy), nemohly podobně ovlivnit a deformovat i KIR genotyp? Jinými slovy, je repertoár KIR repertoár u populace s uniformním HLA genotypem stejně deformován

směrem k podobné uniformitě? Prezentovaná data o společné evoluci HLA a KIR by tuto hypotézu podporovala. Vhodnou populací k ověření této hypotézy by evidentně mohla být HLA uniformní kohorta, čili soubor selektovaný na základě jednoznačného HLA genotypu. Příkladem může být skupina jedinců homozygotních na AH8.1 haplotyp. Podrobná analýza genotypů KIR a obecně repertoáru genů KIR u takovéto skupiny by teoreticky mohla přispět k hlubšímu poznání principů společné evoluce KIR a HLA genů.

#### **1.1.8.2 Implikace pro transplantace krvetvorných buněk**

V důsledku již zmíněné odlišné chromozomální lokalizace KIR a HLA a tudíž nezávislé segregace obou genových systémů je zřejmé, že páry perfektně shodné v HLA systému jsou obvykle neshodné v genech KIR systému. V současnosti jsou již k dispozici ověřená data, že výsledek transplantace krvetvorných buněk (HCT = hematopoietic cell transplantation) je kromě stupně HLA shody ovlivněn i interakcí KIR/HLA dárce a příjemce a také i repertoárem KIR genů a KIR genotypu dárce (32-35). Podle některých studií může být i vyšší počet KIR genů příznivým faktorem výsledku HCT (33,34) a typ KIR genotypu příjemce by mohl být jedním z kritérií výběru nepříbuzného dárce v případech, kdy je k dispozici více HLA shodných nepříbuzných dárců. Nicméně reálně je obvykle počet perfektně HLA shodných dárců limitovaný na 1-2 a selekce dle KIR kompozice je neproveditelná. Na druhou stranu dostatek HLA shodných dárců není problémem u pacientů s běžnými HLA fenotypy, typickým příkladem jsou právě pacienti s ancestrálními haplotypy jako je třeba právě AH8.1. U těchto pacientů by teoreticky mohla být selekce HLA shodného dárce podle KIR genotypů aplikovatelná. Je však nutné vyloučit, zdali v důsledku možné koevoluce KIR/HLA není repertoár genů KIR podobně uniformně deformován jako HLA genotyp a tudíž selekce dle KIR není možná.

**Podle našich nejlepších vědomostí však žádná taková podobná studie – tedy studie zkoumající repertoár KIR genů a kompozici KIR genotypů u skupiny osob s frekventním, přesně definovaným HLA genotypem - nebyla dosud provedena.**



## 1.2 Cíle práce

1. Analyzovat repertoár a diverzitu genů KIR u souboru s uniformním, přesně definovaným HLA genotypem – u jedinců homozygotních na ancestrální haplotyp AH8.1
2. Analyzovat diverzitu genotypů KIR u této HLA uniformní populace.
3. Srovnat repertoár genů KIR a diverzitu genotypů KIR pro tuto HLA selektovanou populaci s analogickými publikovanými daty pro
  - a) neselektovanou populaci v České republice
  - b) celosvětovou populaci.
4. Korelovat naše nálezy s hypotézou vzájemné evoluce (ko-evoluce) KIR a HLA systému.
5. Definovat potenciální klinické důsledky pro transplantační imunogenetiku

## 1.3 Materiál a metody

### 1.3.1 Studovaná populace, výběr jedinců.

Do studie byli zahrnuti nepříbuzní jedinci výhradně z České republiky, genetický původ byl u všech výhradně indoevropský ("kavkazoidní" -Caucasian). Všechny subjekty byli potenciálními dobrovolnými nepříbuznými dárci krvevorných buněk, kteří vstoupili do Českého Národního Registru Dárců Dřevě (ČNRDD) se sídlem v Plzni. U všech byla při náboru provedena izolace DNA ze vzorku periferní krve a HLA typizace (I. třída HLA – HLA-A,-B,-C sérologicky a II. třída HLA, jmenovitě HLA-DRB1, molekulárně-genetickými typizačními technikami). Izolovaná DNA je u všech dárců uchovávána v Centrálním HLA depozitáři k další molekulárně-genetické subtypizaci dle potřeby. Všichni dárci ČNRDD standardně vstupně podepisují informovaný souhlas k využití jejich DNA k další typizaci a k využití získaných anonymizovaných dat k imunogenetickému výzkumu.

Nejdříve bylo z databáze ČNRDD identifikováno 51 jedinců s HLA fenotypem A1,- B8,- DRB1\*03, tedy fenotypem pravděpodobně tvořeným 2 zděděnými ancestrálními haplotypy AH8.1. Protože však byli typizováni v různou dobu různými technikami (sérologie a DNA typizace) a v různých laboratořích, bylo nutné jejich předpokládaný homozygotní HLA fenotyp ověřit na molekulárně-genetické úrovni, čili stanovit komplexní HLA genotyp. Všichni byli tudíž nejprve retypizováni molekulárně-genetickými (DNA) typizačními technikami z uskladněné DNA. Pouze osoby, u nichž byl jednoznačně potvrzen následující HLA genotyp:

*HLA-A\*01:01g-B\*08:01g-C\*07:01g-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01,*

tedy genotyp jednoznačně komponovaný z 2 AH8.1 haplotypů, byli dále zahrnuti do studie a byla u nich provedena typizace genů KIR. U 10 jedinců DNA typizace zjistila vstupně chybně stanovený fenotyp a tito byli ze studie vyřazeni. Výsledně tedy

celá studie zahrnovala čtyřicet jedna (41) jedinců, u kterých byla provedena genotypizace KIR genů.

### **1.3.2 HLA typizace**

DNA byla izolována z 200  $\mu$ l plné periferní krve odebrané pro rutinní HLA typizaci při registraci dárce. Použita byla výhradně kolonková metoda pomocí běžných komerčních kitů (NucleoSpin Blood Kit, Macherey-Nagel, Germany nebo Qiamp Blood Kit, Qiagen, Germany).

HLA typizace na úrovni alelického (tzv. vysokého) rozlišení byla prováděna metodikou polymerázové řetězové reakce s použitím sekvenčně specifických primerů (PCR-SSP) pomocí komerčních kitů pro všechny vyšetřované lokusy (Olerup<sup>TM</sup>SSP, Norsko).

### **1.3.3 KIR genotypizace**

Pro KIR genotypizaci byla použita také metodika PCR-SSP a to opět s pomocí komerčního kitu – Olerup<sup>TM</sup> KIR Genotyping Kit (Olerup<sup>TM</sup>SSP, Norsko). Kit umožňuje spolehlivé určení kompletního repertoáru všech 14 KIR genů a 2 KIR pseudogenů. Použitá metodika současně umožňuje také stanovit typy alel genu K2DS4 s různou expresí – rozliší totiž exprimované alely KIR2DS4\*001/002 od neexprimovaných alel 2DS4\*003/004/006.

### **1.3.4 Stanovení a definice KIR genotypů, statistické zhodnocení**

Definice KIR haplotypů A a B, stejně tak jako genotypové kombinace haplotypů (AA, AB nebo BB) byly odvozeny z typu a počtu zastoupených KIR genů dle Hsu et al (10). Frekvence nositelů specifických KIR genů (CF = carrier frequencies) byly stanoveny jednoduchým přímým spočítáním. Vlastní genové frekvence KIR genů (GF= gene frequencies) byly kalkulovány použitím vzorce  $GF = 1 - \sqrt{1 - CF}$ . Chybějící ("missing") KIR ligand byl definován jako přítomnost individuálního KIR genu při absenci jeho korespondujícího HLA partnera (ligandu). V naší kohortě se

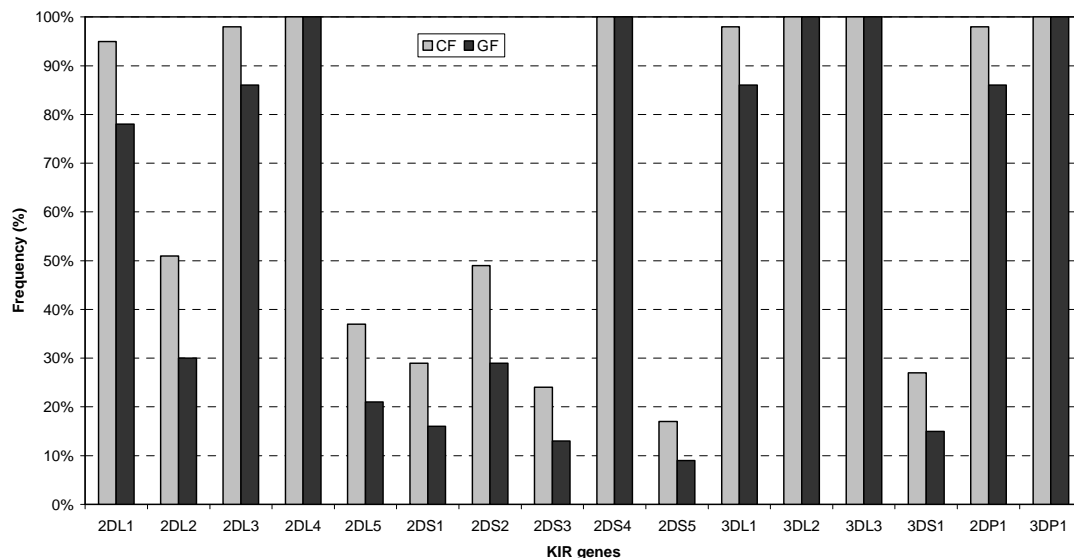
toto logicky týkalo výhradně jedinců, kteří měli přítomný gen 2DL1 (HLA-C skupina 2 a/nebo 3DL1 (HLA-Bw4) a/nebo 3DL2 (HLA-A3/11).

## 1.4 Výsledky

Genotypizace KIR metodou PCR umožnila jednoznačnou identifikaci KIR genů a KIR genotypů u všech 41 studijních jedinců

### 1.4.1 KIR geny

Individuální nosiči KIR genů (CF) a celkové genové frekvence (GF) jsou shrnuty v obrázku 1. Podle očekávání byly obecně frekvence inhibičních genů vždy vyšší než frekvence genů aktivačních, jedinou výjimku tvoří KIR2DS4 gen. Takzvané „framework“ KIR geny (3DL3, 3DL2, 2DL4 and 3DP1) byly zjištěny u všech vyšetřovaných osob. Geny s frekvencí více než 90 % zahrnovaly KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DS4 and KIR2DP1, tyto geny tedy reprezentovaly nejčastější „non-framework“ KIR lokusy. S výjimkou již zmiňovaného KIR2DS4 (frekvence 100 %) byla frekvence výskytu všech ostatních aktivačních KIR genů pod 50 %. Subtypizace KIR genu 2DS4 prokázala, že funkční, „nezkrácený“ receptor byl přítomen u 54 % jedinců (viz tabulka 1). Nejvzácněji se vyskytujícím aktivačním KIR genem byl KIR2DS5 (17 %), zatímco mezi inhibičními geny to byl KIR2DL5 (37 %).



Obrázek 1. Frekvence jednotlivých KIR genů podle nositelů („carrier frequency-CF) a vlastní genové frekvence (GF)

Přehled frekvencí KIR genů spolu s formálním srovnáním jejich frekvence u neselektované, české populace, tak jak byla publikována Pavlovou a spol. (30), shrnuje též tabulka 1. Provedli jsme formální statistické srovnání frekvenčních dat naší populace se zmíněnými, nedávno publikovanými daty pro českou populaci, a zjistili jsme, že jediné statisticky signifikantní rozdíly jsou ve vyšším výskytu KIR 2DL3 (98 % vs. 86 %,  $p=0,456$ ), respective KIR2DS4 (100 % versus 92 %,  $p< 0,001$ ) u naší selektované populace.

KIR gen	AH8.1 - % jedinců (počet) (n= 41)	Česká populace (Pavlova, 30 ) (n= 125) %	
2DL1	95 (39)	95	
2DL2	51 (21)	59	
2DL3	98 (40)	86	p=0,0456
2DL4	100 (41)	100	
2DL5A	29 (12)	35	
2DL5B	29 (12)	30	
2DS1	29 (12)	43	
2DS2	49 (20)	57	
2DS3	24 (10)	36	
2DS4 celkem	100 (41)	92	p< 0,001
2DS4*001/002	54 (22)	-	
2DS4*003/004/006	46 (19)	-	
2DS5	17 (7)	26	
3DL1	98 (40)	94	
3DL2	100 (41)	100	
3DL3	100 (41)	100	
3DS1	27 (11)	38	
2DP1	98 (40)	94	
3DP1	100 (41)	100	

Tabulka 1:

Distribuce KIR genů u populace AH8.1 homozygotní a srovnání s neselektovanou českou populací.

#### **1.4.2. KIR-HLA ligand kontext**

Kombinace inhibičních KIR s jejich HLA partnery (ligandy) a i jejich frekvence ve studované populaci shrnuje tabulka 2. S ohledem na vstupní kritéria (homozygocie na AH8.1), byla naše kohorta uniformní populací charakterizovanou výlučnou izolovanou přítomností HLA

ligandu C1 (tj. HLA-C\*07:01) a současně absencí ligandů skupiny C2 a Bw4. Vskutku, u všech individuů byl prokázán inhibiční KIR pro „vlastní“ HLA ligand C\*07:01 (C1 skupina- 2DL2/3).

Detailní analýzu párů KIR-C1 ligand ukazuje detailně tabulka 2. U 20 jedinců (49 %) byl zjištěna KIR-ligand HLA dvojice pouze s nízkou afinitou vazby, tedy 2DL3 pozitivní/2DL2 negativní – C1 ligand). A naopak 51 % (n=21) jedinců z našeho panelu neslo dvojici KIR-ligand HLA se střední afinitou, tj. byli 2DL2 pozitivní (z nich pak 20 současně i s 2DL3 pozitivitou a 1 byl 2DL3 negativní, viz též tabulka 2). Je zajímavé, že 8 jedinců (19,5 % z celého souboru) ze skupiny s nízkou afinitou KIR-ligand páru mělo deleční variantu 2DS4 genu (jedná se o alely 2DS4\*003/004/006) a současně AA KIR genotyp (tedy genotyp charakteristický absencí jiných aktivačních KIR genů mimo onen 2DS4). Tito jedinci by tedy teoreticky neměli mít žádný funkční aktivační KIR a reprezentují tak skupinu s minimálně funkčním KIR-HLA ligand párem.

KIR geny	HLA ligandy (skupina)	Počet jedinců s KIR genem	Frekvence jedinců s přítomným KIR genem
<b>KIR2DL2/3</b>	<b>C1 (Ser77,Asn80)</b>	<b>41</b>	<b>100%</b>
2DL2pos/2DL3neg		1	2.4%
2DL2pos/2DL3pos		20	48.8%
2DL2neg/DL3pos		20	48.8%
KIR2DL1	<b>C2 (Asn77,Lys80)</b>	39	95%
KIR3DL1	Bw4	40	98%
KIR3DL2	A3/11	41	100%

Tabulka 2:  
Kombinace inhibičních KIR genů s odpovídajícími HLA ligandy a jejich frekvence



### 1.4.3. KIR genotypy

V analyzované skupině 41 jedinců jsme identifikovali celkem 14 genotypů KIR. Jejich kompletní přehled, včetně obsahu jednotlivých genů KIR shrnuje obrázek 2. Nejčastěji (16 jedinců, tedy 39 %), byl zaznamenán genotyp, který odpovídá svou kompozicí 2 homozygotním haplotypům typu A, tedy genotyp AA obsahující 9 genů KIR. 22 jedinců (54 % mělo genotyp, který obsahoval 1 kopii genotypu A a 1 kopii genotypu B, čili AB genotyp. A konečně u 3 osob (7 %) byly zjištěny pouze kopie genotypu B, tito tedy měli BB genotyp. Když jsme porovnali kompozici genotypů v naší, přísně „HLA genotypicky selektované“ skupině s dosud popsány genotypy v databázi genotypů KIR ([www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net)), pak jsme zjistili, že celkem 5 genotypů (třikrát AB a dvakrát BB, jde o genotypy ID 8,9,10,13 a 14 na obr. 1) bylo zaznamenáno celosvětově u méně než 20 jedinců, přičemž jeden z těchto fenotypů (ID 8) byl popsán dosud pouze jedenkrát!

Na druhé straně 3 nejčastější genotypy v naší skupině – na obrázku 1 jde o genotypy ID 1-3 – reprezentovaly podíl více než 2/3 (přesně 68 %) všech detekovaných genotypů souboru.

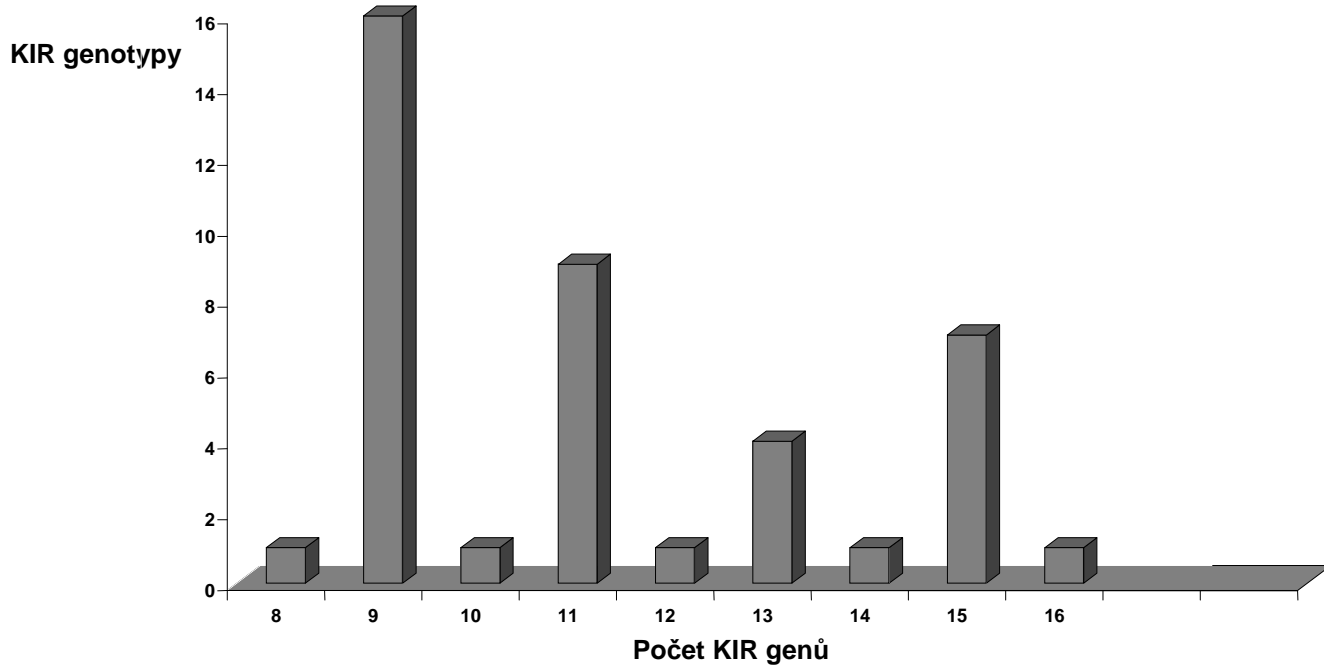
Jak již bylo zmíněno výše, 8 z těchto 16 jedinců s AA genotypem mělo deleční variantu KIR2DS4 genu (alely 2DS4\*003/004/006) a tito jedinci tedy měli velmi malou pravděpodobnost exprese jakéhokoliv funkčního aktivačního genu KIR na povrchu buněk. Tudíž pro 19,5 % naší populace byla charakteristická absence funkčního aktivačního genu KIR.

Počet genů KIR (včetně pseudogenů) se v jednotlivých genotypech KIR pohyboval od 8 do 16 (medián 11). Zastoupení individuálního počtu KIR genů v různých KIR genotypech je znázorněno na obrázku 3. Nejčastěji bylo v KIR genotypu přítomno 9 KIR genů (celkem v 16 případech), což odpovídá počtu KIR genů v nejčastěji se vyskytujícím AA genotypu (viz výše).

Genotyp ID	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	2DS5	3DL1	3DL2	3DL3	3DS1	2DP1	3DP1	Počet KIR genů (n)	Haplootypy	Počet jedinců	Frekvence genotypu (%)	Česká populace <sup>(30)</sup> (n=125)	
																					Počet jedinců	Frekvence genotypu
1																	9	AA	16	39	32	25.6
2																	11	AB	8	19.5	14	11
3																	15	AB	4	9.8	10	8
4																	13	AB	2	4.9	7	6
5																	13	AB	2	4.9	7	6
6																	15	AB	1	2.4	5	4
7																	8	BB	1	2.4	4	3
8																	11	AB	1	2.4	0	0
9																	15	AB	1	2.4	0	0
10																	10	BB	1	2.4	0	0
11																	14	AB	1	2.4	1	1
12																	16	AB	1	2.4	7	6
13																	12	BB	1	2.4	0	0
14																	15	AB	1	2.4	0	0

Obrázek 2: Frekvence KIR genotypů u AH1.8 homozygotní populace. V našem panelu 41 nepříbuzných jedinců bylo identifikováno 14 různých genotypů. V porovnání s dosud popsány genotypy v databázi KIR genotypů ([www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net)) bylo celkem 5 genotypů (genotypy ID 8, 9, 10, 13, a 14) celosvětově dosud zaznamenáno u méně než 20 jedinců a z nich 1 genotyp (ID 8) byl reportován pouze jedenkrát. Poslední 2 sloupce ukazují formální srovnání s genotypy zaznamenanými v neselektované české populaci dle Pavlovové a spol. (30)

Obrázek 3: Počet KIR genů zjištěných v různých genotypech a počet KIR genotypů s tímto počtem genů



## 1.5. Diskuze

V naší studii jsme hodnotili frekvenci genů a genotypů KIR ve skupině 41 nepříbuzných jedinců s uniformním, striktně definovaným konzervovaným genotypem HLA. Byla potvrzena široká variabilita genotypů KIR, která je nezávislá na fenotypu HLA. Přestože jedinci našeho studijního souboru byli vybráni na základě jednoznačně definovaného genotypu HLA, kompozice genů a genotypů KIR obecně korespondovala s publikovanými daty u "HLA neselektované" indoevropské („kavkazoidní“) populace (11,12).

Frekvence KIR genů prakticky zrcadlila dosud publikovaná data o frekvenci genů v neselektované kavkazoidní populaci. Vysoká frekvence takzvaných "non-framework" inhibičních KIR – jmenovitě KIR2DL1, KIR2DL3 a KIR3DL1, stejně tak jako aktivačního KIR2DS4 a pseudogenu KIR2DP1 - byla dokumentována u všech studií indoevropské populace (11,12,22). V naší práci jsme i formálně statisticky porovnali naše data s genovými a genotypickými frekvenčními daty, která pro neselektovanou českou populaci nedávno publikovala Pavlovová a kol (30, viz tabulka 1). Zjistili jsme, že jediným statisticky signifikantním rozdílem byla vyšší frekvence KIR2DL3 (98 % versus 86 %,  $p=0,0456$ ), respektive KIR2DS4 (100 % versus 92 %,  $p<0,001$ ).

Do současnosti bylo popsáno více než 100 genotypů KIR a genetická diverzita KIR systému tak v mnohém připomíná extrémní diverzitu genů HLA systému. Přestože jsou geny kódující KIR systém umístěny na jiném chromozómu než geny kódující HLA systém a oba systémy se tedy segregují teoreticky zcela nezávisle, existují celkem přesvědčivé důkazy o alespoň nějaké vzájemné vývojové evoluci (koevoluci) obou systémů (22). Teoreticky by tudíž bylo možno předpokládat, že u silně selektované populace s uniformním HLA fenotypem a tedy reálně s nulovou HLA diverzitou, bude stejným způsobem aspoň částečně eliminována či alespoň snížena i diverzita genů KIR. Tato hypotéza však nebyla naší studií potvrzena, naopak, data našeho souboru

ukazují na zcela neomezenou, zachovanou diverzitu genotypů KIR. V naší kohortě 41 HLA genotypicky uniformních jedinců jsme totiž rozpoznali celkem 14 různých genotypů KIR. Kompozice genotypů KIR v naší populaci byla víceméně identická s publikovanými údaji o repertoáru genotypů KIR jak u neselektované indoevropské populace (13, 27-30), tak u neselektované české populace, jejíž data byla nedávno publikována Pavlovou a spol (30, viz obrázek 2). Genotyp, který byl dosud ve všech populačních studiích detekován nejčastěji – genotyp AA, byl též nejčastější i v našem souboru (genotyp ID č. 1, 39 %, viz obr. 2). Tři genotypy s největší frekvencí v naší studii (genotyp ID 1-3), byly také genotypy s největší frekvencí v práci Pavlovové a spol. (30). Na druhé straně, 5 genotypů naší kohorty (ID 8-10, 13-14) nebyly ve zmíněné studii vůbec zaznamenány. Navíc některé naše genotypy byly dle údajů v databázi genotypů KIR („Allele Frequencies in Worldwide Populations“, 13) reportovány celosvětově u méně než 20 jedinců. Například genotyp číslo 8 byl publikován pouze jedenkrát u jedince ze singapursko-čínské populační studie (36) a genotyp číslo 14 byl zase detekován pouze u 6 osob z Íránu (37). Přítomnost těchto genotypů, které jsou vzácné nejen u indoevropské (kavkazoidní), ale i u non-kavkazoidní populace byla poměrně překvapivá a neočekávaná. S ohledem na selekční kritéria naší populace lze tento fakt těžko přičíst na vrub náhodnému rasovému promíšení.

Du a kol. zjistil, že přibližně 4 % jedinců z neselektované indoevropské populace nesou pouze jediný inhibiční KIR-HLA pár a přitom nemají žádný funkční aktivační KIR gen. Tuto KIR-HLA konfiguraci interpretoval jako základní („minimální“) humánní genotyp KIR, který umožňuje vykonávat NK buňkám jejich bazální funkce (38). V naší populaci jsme zjistili signifikantně vyšší podíl takovýchto jedinců – 19,5 %. Toto zjištění by sice mohlo být poměrně jednoduše vysvětleno „HLA selekcí“ našeho souboru, nicméně by rozhodně zasluhovalo dalšího zkoumání na větším vzorku populace.

Přes odlišnou chromozomální lokalizaci a tudíž i nezávislou segregaci HLA a KIR genů, jejich velmi úzká interakce v imunitní odpovědi

samozřejmě implikuje hypotézu o alespoň částečné společné evoluci a vzájemné pozitivní i negativní selekci určitých kombinací KIR-HLA (22). Yawata a kol. demonstroval pomocí buněčných a genotypických esejí, že interakce mezi HLA a KIR ovlivňuje či spíše určitým způsobem formuje KIR repertoár jak po stránce genotypu tak po stránce fenotypu (39). Naše studie tuto hypotézu nepotvrzuje, minimálně pokud jde o jedince s AH8.1 haplotypem. Naopak, spíše podporuje zcela odlišný model balancované selekce jak pro KIR, tak pro HLA komplex. Je zřejmé, že naše studie je limitována tím, že zkoumá pouze genotypy a ne jejich funkční inhibiční kapacitu, frekvenci buněčné exprese či úroveň celulární exprese různých alotypů KIR receptorů. Tudíž stejně tak nemůžeme uvedenou hypotézu Yawaty a kol. (39) ani jednoznačně a přesvědčivě vyloučit.

Naše zjištění nepochybně mají určité závažné důsledky pro klinickou praxi, jmenovitě pro oblast transplantace krvevorných buněk (HCT). Výsledek HCT je totiž velmi pravděpodobně ovlivněn typem KIR-HLA interakcí dárce a příjemce, tj. KIR repertoárem dárce ve vztahu k HLA fenotypu příjemce (32). Podle recentních studií může být významným faktorem dokonce i pouhý počet KIR a typ KIR haplotypu, neboť u pacientů transplantovaných s dárci majícími větší počet KIR genů či s dárci nesoucími KIR haplotyp B byl zaznamenán příznivější výsledek HCT (33,34). Logickým důsledkem by samozřejmě pak mohlo být, že repertoár KIR genů (jejich počet a typ, typ haplotypů) by mohl být jedním z kritérií výběru nejvhodnějšího dárce v situacích, kdy je k dispozici více nepříbuzných dárců. Nicméně, v reálné praxi je obvykle počet perfektně HLA shodných dárců (tedy 10 alel z 10 na úrovni alelického rozlišení) obvykle limitovaný na 1-2 a aplikace tohoto kritéria je stěží uplatnitelná. Na druhé straně však u pacientů s běžným fenotypem HLA je logicky vždy dostatečný počet perfektně HLA shodných nepříbuzných dárců. Typickými příklady takovýchto jedinců jsou právě nemocní s ancestrálními HLA haplotypy, jako je námi zkoumaný AH8.1. V naší studii jsme jednoznačně demonstrovali výraznou diverzitu, pokud jde o repertoár KIR genů a genotypů i u takto

HLA-deformované populace. Naše výsledky tak dokládají, že u pacientů s běžnými (ancestrálními) HLA fenotypy je prakticky realizovatelná selekce HLA shodných dárců dle kompozice genů KIR a že je tudíž u těchto pacientů, kteří mají typicky mnoho dárců, možno plně využít potenciální příznivý vliv aloreaktivity NK buněk na výsledek HCT. Zjištění, že všichni jedinci měli alespoň 1 inhibiční KIR pro nepřítomný HLA ligand lze zase využít v budoucích studiích testujících takzvaný „missing ligand“ koncept problematiky HCT (32,35).

Využití našich dat v transplantacích solidních orgánů je samozřejmě složitější, neboť dárci orgánů zde obvykle není vybírán prospektivně. Nicméně i zde informace o nezměněné diverzitě repertoáru genů a genotypů KIR může mít potenciální klinický význam, neboť i zde logicky velká část „náhodných“ kadaverózních dárců ponese ancestrální haplotypy HLA. Bylo například doloženo, že vyšší počet aktivačních genů KIR, který obsahují haplotypy B má protektivní vliv na riziko cytomegalovirové infekce či reaktivace (40).

Lze-li shrnout, pak výše uvedená práce je první dosud publikovanou studií zkoumající kompozici KIR genů a genotypů v populaci jedinců s ancestrálním AH8.1 HLA fenotypem. Naše výsledky jednoznačně dokládají konzervovanou diverzitu i u této selektované populace a mohou sloužit jako základ pro další analýzu interakce a evoluce KIR a HLA systémů.

## 1.6. Závěr

Všechny vytýčené cíle práce definované v části 1.2 byly splněny:

Cíl 1&2:

- ✓ Byla provedena komplexní a detailní analýza repertoárů genů a genotypů KIR u populace s jasně definovaným HLA genotypem. Nebylo zjištěno žádné omezení diverzity repertoáru genů KIR genů. Byla zjištěna světově prioritní data o zachované a neomezené diverzitě genotypů KIR u této populace uniformní co do HLA genotypu.

Cíl 3:

- ✓ Ve zmíněných parametrech nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi naší populací a běžnou neselektovanou českou populací. Stejně tak nebyly zaznamenány podstatné rozdíly v diverzitě repertoáru genů a genotypů KIR mezi naší skupinou a daty pro celosvětovou populaci.

Cíl 4:

- ✓ Zjištěné výsledky nepodporují hypotézu vzájemné společné evoluce systémů HLA a KIR. Naopak, zachovaná diverzita KIR u HLA uniformní (konzervované) populace ukazuje spíše na rozdílné faktory působící na selekci genotypů KIR a HLA

Cíl 5:

- ✓ Naše výsledky dokládají, že u pacientů s běžnými HLA fenotypy je prakticky realizovatelná selekce HLA shodných dárců dle kompozice genů KIR a je tudíž i u těchto pacientů, kteří obvykle mají mnohohlas shodných dárců, možno plně využít potenciální příznivý vliv aloreaktivity NK buněk na výsledek HCT



## 1.7. Seznam použité literatury

1. Robertson, MJ&Ritz J (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990: 76, 2421
2. Colonna M, Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 1993: 260:1121-4
3. Gasser S, Raulet DH. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol Rev* 2006,214: 130
4. Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A et al. Natural killer cells receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002, 100:193
5. Middleton D, Curran M, Maxwell I. Natural killer cells and their receptors. *Transplant Immunol* 2002,10:147-64
6. Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors. *Current Opinion in Immunology* 2004: 16: 626-33
7. Colonna M, Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 1993: 260: 1121-4
8. Robinson J, Waller MJ, Stoehr P, Marsh SGE. IPD - the Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Research* 2005: 33: 523-526
9. Marsh SGE, Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H. Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Nomenclature Report, 2002. *Tissue Antigens* 2003: 62: 79-86
10. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological Review* (2002) 190:40-52
11. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* (1997) 7:753-63
12. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological Review* (2002) 190:40-52
13. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. New Allele Frequency Database: <http://www.allelefreqencies.net>. *Tissue Antigens* 2003, 61, 403-407.
14. Neefjes, JJ, Momburg F: Cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, 1993, 5: 27-35
15. Thorsby E: MHC structure and function. *Transplant Proc* 1999,31:713

16. Campbell RD, Trowsdale J: A map of the major histocompatibility complex. *Immunol Today* 1997, 18: 43
17. Jeffreys AJ, Holloway JK, Kauppi L, May CA, Neumann R, Slingsby MT et al. Meiotic recombination hot spots and human DNA diversity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004, 359, 141-152
18. Messaoudi I, Guevara Patino JA, stall R, LeMaoukl J, Nikolich-Zugich J. Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity , and diversity in immune defense. *Science* 2002, 298: 1797-1800
19. Trowsdale J. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity* 2001: **15**: 363–74.
20. Vilches C, Parham P. KIR: Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2002: **20**: 217–51.
21. Guethlein LA, Older Aguilar AM, Abi-Rached L, Parham P. Evolution of killer cell Ig-like receptor (KIR) genes: definition of an orangutan KIR haplotype reveals expansion of lineage III KIR associated with the emergence of MHC-C. *J Immunol* 2007: **179**: 491–504
22. Single RM, Martin MP, Gao Xet al. Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA. *Nature Genetics* 2007: 39: 1113
23. Khakoo SI, Rajalingam R, Shum BP et al. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity* 2000: **12**: 687–98
24. Hollenbach JA, Meenagh A, Sleator C, Alaez C, Bengoche M, Canossi A, Contreras G et al. Report from the killer immunoglobulin-like receptor (KIR) anthropology component of the 15th International Histocompatibility Workshop: worldwide variation in the KIR loci and further evidence for the co-evolution of KIR and HLA. *Tissue Antigens* 2010, 76:9-17
25. Parham, P. (2005) MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature Reviews.Immunology*, 2005, **5**, 201.
26. Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenetics* 2008, 35:179-192
27. Witt CS, Dewing C, Sayer DC et al. Population frequencies and putative haplotypes of the killer cells immunoglobulin-like receptors sequences and evidence for recombination. *Transplantation* 1999,68,1784-9
28. Toneva M, Lepage V, Lafay G et al. Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens* 2001, 57, 358-62
29. Norman PJ, Stephens HAF, Verity DH et al. Distribution of natural killer cell immunoglobulin like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics* 2001, 52,195-205
30. Pavlova Y, Kolesar L, Striz I, Jabor A, Slavcec A. Distribution of KIR genes in the Czech population. *Int J Immunogenetics* 2008 (35), 57-61
31. Smith,W.P., Vu, Q., Li, S.S., Hansen, J.A., Zhao, L.P. & Geraghty,D.E. Toward understanding MHC disease associations:

- partial resequencing of 46 distinct HLA haplotypes. *Genomics*, 2006, **87**, 561.
32. Miller JS, Cooley S, Parham P, Farag SS, Verneris MR, McQuenn KL, Guethlein LA, Trachtenberg EA, Haagenson M, Horowitz MM, Klein JP, Weisdorf DJ. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated allogeneic HCT. *Blood* 109, 5058-5061, 2007
  33. Cook M, Briggs D, Craddock C, Mahendra P, Milligan D, Fegan C, Darbyshire P, Lawson S, Boxall E, Moss P. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 107, 1230-1232, 2006
  34. Cooley S, Trachtenberg E, Bergemann TL, Saeteurn K, Klein J, Le CT, Marsh SGE, Guethlein LA, Parham P, Miller JS, Weisdorf DJ. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood* 113, 726-732, 2009
  35. Katharine C. Hsu, Carolyn A. Keever-Taylor, Andrew Wilton, Clara Pinto, Glenn Heller, Knarik Arkun, Richard J. O'Reilly, Mary M. Horowitz, Bo Dupont. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes *Blood*, Jun 2005; 105: 4878 - 4884.
  36. Lee YC, Chan SH, Ren EC. Asian population frequencies and haplotype distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes among Chinese, Malay, and Indian in Singapore. *Immunogenetics* 2008; 60: 645-654
  37. Ashouri E, Farjadian S, Reed EF, Ghaderi A, Rajalingam R. KIR gene content diversity in four Iranian populations. *Immunogenetics* 2009; 61: 483-492
  38. Du Z, Gjertson DW, Reed EF, Rajalingam R. Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans. *Immunogenetics* 2007; 59: 1-15
  39. Yawata M, Yawata N, Draghi M, Little AM, Partheniou F, Parham P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cells repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 2006; 203: 633-645
  40. Stern M, Elsässer H, Hönger G, Steiger J, Schaub S, Hess C. The Number of Activating KIR Genes Inversely Correlates with the Rate of CMV Infection/Reactivation in Kidney Transplant Recipients *Am J Transpl* 2008, 8, 1312-1317

### **1.8 Příloha: Manuskript:**

Jindra P, Venigová P, Lysák D, Steinerova K, Koza V. Distribution of KIR genes in the population of unrelated individuals homozygous for ancestral haplotype AH8.1 (HLA-A1B8DR3).

Tissue Antigens. 2010 Sep; 76(3):240-4.

***IF 2,33***

BRIEF COMMUNICATION

## Distribution of KIR genes in the population of unrelated individuals homozygous for ancestral haplotype AH8.1 (HLA-A1B8DR3)

P. Jindra<sup>1,2</sup>, P. Venigová<sup>2</sup>, D. Lysák<sup>1</sup>, K. Steinerová<sup>1</sup> & V. Koza<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup> Czech National Marrow Donors Registry, Pilsen, Czech Republic

**Key words**

AH8.1; genetic diversity; genotype; haplotype; human leukocyte antigen; killer immunoglobulin-like receptor

**Correspondence**

Pavel Jindra, MD  
HLA laboratory  
University Hospital Pilsen  
alej Svobody 80  
Pilsen 304 60  
Czech Republic  
Tel: +42 03 7710 4827  
Fax: +42 03 7710 4623  
e-mail: jindra@fnplzen.cz

Received 28 January 2010; revised 12

March 2010; accepted 29 March 2010

doi: 10.1111/j.1399-0039.2010.01504.x

**Abstract**

Despite the independent segregation of genes encoding killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and human leukocyte antigen (HLA), there is some evidence of some kind of co-evolution. Therefore, one could expect reduced KIR diversity within the HLA restricted population. A total of 41 unrelated individuals homozygous for ancestral HLA haplotype AH8.1 (HLA-A\*0101-Cw\*0701-B\*0801-DRB1\*0301-DQB1\*0201) were genotyped for KIRs. Over all, 14 different genotypes were identified. The KIR genes and genotypes repertoire generally mirror the published frequencies in Caucasians. Except for KIR2DS4, all activating genes presented frequencies below 50%. KIR2DS5 was the least frequent among activating genes (17%), whereas KIR2DL5 (37%) among inhibitory ones. The most frequent (39%) was AA genotype. Twenty-two individuals (54%) had a copy of KIR haplotypes A and B (AB genotype), whereas three (7%) were homozygous for B (BB genotype). Nine of fourteen reported genotypes occurred only in one individual. Five genotypes were reported in less than twenty individuals worldwide and one genotype was reported so far only once. Conversely, the three most frequent genotypes account for 68% of all detected genotypes. The results show the unrestricted KIR diversity in this HLA uniform group and support the fact that the driving force for KIR evolution is not exclusively a major histocompatibility complex.

Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) are a family of membrane receptors expressed by natural killer (NK) cells. NK cells play a dominating role in the innate immune system and are attacking virally infected, tumour cells (1) and allogeneic cells as well (2). The killing of target cells is mediated by opposite signals delivered by inhibitory and activating KIRs (3, 4). The nomenclature of KIRs is designated according to their structural and functional characteristics, i.e. taking into account the number of extracellular immunoglobulin domains (2D and 3D molecules, respectively) and the presence of either a short or a long cytoplasmic tail. Short tails correspond to activating, whereas long tails to inhibitory KIRs (5). Human leukocyte antigen (HLA)-C and HLA-Bw4 serve as epitopes for inhibitory KIRs (6). To date, 16 KIR genes were identified, of which 14 being expressed and 2 being pseudogenes (KIR2DP1 and KIR3DP1). All are located on chromosome19q13.4 and allelic variations exist for each gene (7, 8).

According to the variations of the KIR genes content and order, multiple KIR haplotypes were defined in population studies. The haplotypes could be divided into two primary sets termed A and B, differing in the gene number and repertoire and gene allelic polymorphism as well (9). The extreme diversity of KIRs in humans resembles the diversity of HLA system, in terms of phenotypic expression is actually more diverse. Despite the location on different chromosomes and consequent independent segregation of both gene complexes (i.e. HLA and KIR), the interactions between the KIR and HLA (class I) polymorphism are evident (10).

Many studies analysing the KIR gene diversity in different populations were published (11–13). However, no study analysing the frequencies of KIR genes in most frequent long-range major histocompatibility complex haplotypes in Caucasians – e.g., A1-B8-C7-DR3-DQ2 (also termed AH8.1) – has been performed so far. The objective of our study was to look into the KIR genes and genotypes in the

## **2 Publikované nové objevené alely či genomické aberace alel HLA systému**

**2.8** Venigová P, Jindra P, Koza V. Detection of a B-acute lymphoblastic leukemia blast-specific mutation in HLA-B\*39:01. Accepted for publication, Int J Immunogenetics

***IF 1,522***

**2.9** Karvunidis T, Jindra P, Fischer G, Venigova P, Dorner A, Koza V. Identification of a novel HLA-DRB1\*14 allele, HLA-DRB1\*1458, by sequence-based typing. Tissue Antigens. 2007 Oct; 70(4):348-9.

***IF 2,33***

**2.10** Horn PA, DeLuca DS, Jindra P, Blasczyk R. The replacement mutation in HLA-DRB1\*1211 affects a likely keystone position. Hum Immunol. 2005 Dec; 66 (12):1254-7.

***IF 2,550***



## Detection of A B acute lymphoblastic leukaemia blast-specific mutation in HLA-B\*39:01

P. Venigová\*, P. Jindra\*† & V. Koza\*†

### Summary

Human leucocyte antigen (HLA) modifications observed in blast cells in haematologic malignancies can play an important role in disease progression and its therapy. Here we describe an insertion/deletion mutation in the second exon of HLA-B\*39:01 that occurred in the blast cells of a patient with B-ALL. This mutation was not present in the nonleukemic cells, in which HLA-B\*39:01 was normally expressed.

Loss or downregulation of human leucocyte antigen (HLA) class I expression at the allelic level in tumour cells may result in a selective advantage for tumour cell clones. These HLA modifications facilitate tumour cell escape from anti-tumour T-cell immune responses. Such loss or downregulation of HLA molecules has been reported as a relatively frequent event in solid tumours in comparison with haematologic malignancies (Algarra *et al.*, 2000; Brouwer *et al.*, 2000, 2002; Wetzler *et al.*, 2001).

A 57-year-old woman diagnosed with B-ALL was typed at low resolution using PCR-SSP (Qiagen commercial kits Olerup GmbH, Vienna, Austria). To isolate DNA we used a blood sample with more than 90% blast cells. The typing result was HLA-B\*07, 39. A family study was not done because of the unavailability of the parents and siblings. The patient was then referred for allogeneic stem cell transplantation and the original DNA sample was retyped at higher resolution by sequence based typing (SBT; AlleleSEQR, Atria Genetics, USA). Exons 2, 3 and 4 were sequenced in both directions. In this process we observed an anomalous profile of sequences in the second exon and the DNA analysis software (AssignSBT™ software; Conexio Genomics, Australia) indicated it as a heterozygous insertion/deletion (Fig. 1). The insertion/deletion polymorphism resulted in electrophero-

grams which are very difficult to interpret and it was not possible to decide which of the two alleles contained the mutation and whether the mutation was an insertion or deletion (Sayer *et al.*, 2004).

We commonly use group specific amplification mixes and sequencing primers for HLA loci in case of questionable or ambiguous typing results in our lab. Coincidentally, these primers are the same for the allele groups, B\*07 and B\*39, present in this patient and hence we were unable to separate the sequences of these alleles. For this reason we repeated the B\* locus typing of the same DNA using PCR-SSP and again we observed a questionable pattern in high resolution for allele HLA-B\*39. However, the second allele was determined as HLA-B\*07:02.

We hypothesized the mutation was specific only to the blast cells. To confirm this, we performed another SBT from a new blood sample obtained after blast clearance. The profile of the obtained electropherograms did not indicate any mutation in this DNA sample (Fig. 2) and therefore we confirmed the result as HLA-B\*07:02, 39:01.

The very similar case was described by Sayer *et al.* (2004) in allele A\*24:02. Blast cells and nonleukemic mononuclear cells were sorted in this study and HLA-A from both cell populations was sequenced. The results confirmed that only blast cells contained the mutant allele.

Human leucocyte antigen class I antigen defects are likely to play a role in the clinical course of haematologic malignancies and disease progression. On the other hand, HLA mutation specific to the blast cells could be easily missed out by molecular typing procedures analysing only an incomplete DNA sequence of the HLA alleles (PCR-SSP, PCR-SSO). The possibility of blast-specific HLA mutation should thus always be considered in the HLA typing performed on samples with prevailing malignant cells.

\* Czech National Marrow Donors Registry, HLA Laboratory, Pilsen, Czech Republic and † Department of Haematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Czech Republic

Received 16 November 2010; revised 17 January 2011; accepted 20 March 2011

Correspondence: Venigová Petra, Czech National Marrow Donors Registry, HLA laboratory, aleš Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 377 104 640; Fax: XXXXXXX;

E-mail: venigova@kostnidren.cz

### References

- Algarra, I., Cabrera, T. & Garrido, E. (2000) The HLA crossroad in tumor immunology. *Human Immunology*, **61**, 65.
- Brouwer, R.E., van der Heiden, P., Schreuder, G.M.T., Mulder, A., Claas, F.H.J. & Falkenburg, J.H.F. (2000) Allelic loss in HLA class I expression is not a common event in acute

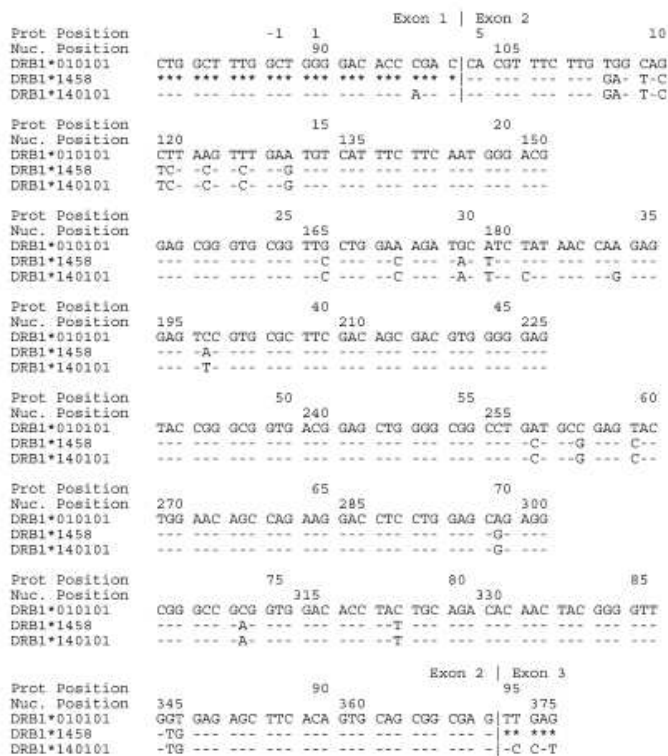
**Identification of a novel HLA-DRB1\*14 allele, HLA-DRB1\*1458, by sequence-based typing**

T. Kavunidis<sup>1</sup>, P. Jindra<sup>1,2</sup>, G. Fischer<sup>3</sup>, P. Venigova<sup>2</sup>, A. Dornier<sup>3</sup> & V. Kozá<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Hematology and Oncology, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic  
<sup>2</sup> Czech National Marrow Donors Registry, Pilsen, Czech Republic  
<sup>3</sup> Department for Blood Group Serology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

**Key words:** HLA-DRB1\*1458; human leukocyte antigen class II; polymerase chain reaction-sequence-specific primer; sequence-based typing

The human major histocompatibility complex is characterized by extremely high polymorphism. HLA-DRB1 is one of the most polymorphic regions and there are almost 500 alleles described currently within this locus (1). Differences in HLA genes, particularly in the class II region, represent the major barrier to hema-



**Figure 1** HLA-DRB1 exon 2 nucleotide sequence alignment of the new HLA-DRB1\*1458 in comparison with HLA-DRB1\*140101. Here are shown the two nonsynonymous and one silent nucleotide substitution within exon 2 of the novel allele: position 181 (codon 32, C → T), position 197 (codon 37, T → A) and position 189 (codon 34, G → A), respectively.

topoietic stem cell transplantation. On the other hand, the application of high-resolution typing method such

**Identification of a novel HLA-DRB1\*1458 allele within a Caucasian individual using sequence-based typing.**

as the sequence-based typing (SBT) has escalated the identification of new alleles.

In this brief report, we describe the identification of a novel HLA-DRB1\*1458 allele in a 21-year-old healthy Caucasian woman. After receiving an atypical polymerase chain reaction-sequence-specific primer

result pattern (A\*0205, 3201, B\*0702, 3906, Cw\*0702, DRB1\*14XX, 1501, DQB1\*0301, 0602) during the routine initial low- and high-resolution HLA class II typing of this bone marrow donor from Czech National Marrow Donors Registry, we confirmed the presence of the potential novel allele by SBT (AlleleSEQR Kits, Abbott, Abbott Park, IL; ABI 310, Applied Biosystems, Foster City, CA; AssignSBT v3.2.7., Conexio Genomics, Applecross, WA, Australia). When compared with all the known HLA-DRB1\*14 alleles (1, 2), we have found two nonsynonymous and one silent nucleotide substitution within the exon 2 of the novel allele





## The Replacement Mutation in HLA-DRB1\*1211 Affects a Likely Keystone Position

Peter A. Horn, David S. DeLuca, Pavel Jindra, and Rainer Blasczyk

**ABSTRACT:** Currently, 10 different amino acid variants of the HLA-DRB1\*12 family are known. We here report the identification of a new HLA-DRB1\*12 allele in a healthy Caucasian male individual. The allele was detected by sequencing-based typing during confirmatory high-resolution typing of an unrelated, male, potential donor from the Czech National Marrow Donors Registry. Compared with DRB1\*120101, to which it is closest, the new variant is characterized by a new replacement mutation (T→C) at nucleotide position 126 of exon 2, resulting in the amino acid substitution Phe→Leu at position 47. Computational analysis reveals that position 47 functions as a keystone in the  $\beta_1$  domain, joining both segments of the  $\alpha$  helix with the  $\beta$  sheet, and plays a major

role in the structural conformation of the binding groove. Additionally, position 47 is part of pocket E of the peptide binding groove and is directly involved in peptide binding. The new allele, DRB1\*1211, is therefore likely to differ substantially from other DRB1\*12 alleles in its peptide binding repertoire and alloreactive potential. *Human Immunology* 66, 1254–1257 (2005). © American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2006. Published by Elsevier Inc.

**KEYWORDS:** peptide binding site; keystone position mutation; sequence-based typing; HLA-DRB1; DRB1\*1211

### ABBREVIATIONS

HLA human leukocyte antigen

PCR polymerase chain reaction

### INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO) Nomenclature Committee for Factors of the HLA System (IMGT/HLA Sequence Database [1]), 10 different amino acid variants of the HLA-DRB1\*12 family are officially recognized to date [2]. In this report, we describe the identification of a novel DRB1\*12 allele, DRB1\*1211<sup>1</sup>, that was found during confirmatory high-resolution sequencing of an unrelated, male, potential donor. There are computational methods available that use crystallo-

graphic data to help understand and predict the significance of HLA protein polymorphisms [3, 4]. In this novel allele, the replacement mutation results in an amino acid substitution at a normally highly conserved keystone position in pocket E of the peptide binding site [5] that joins both segments of the  $\beta_1$  helix with the  $\beta$  sheets. We discuss the implications of exchanging this amino acid and its expected effects on peptide binding and alloreactivity based on the structural changes.

*From the Institute for Transfusion Medicine, Hannover Medical School, Hannover, Germany (P.A.H., D.S.D., R.B.) and the HLA Laboratory, Czech National Marrow Donors Registry, Pilsen, Czech Republic (P.J.).*

*Address reprint requests to: Prof. Dr. Rainer Blasczyk, Transfusion Medicine, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Strasse 1, 30625 Hannover, Germany; Tel.: +49 511 532 6700; Fax: +49 511 532 2079; E-mail: Blasczyk.Rainer@mh-hannover.de.*

*Supported in part by Grant KP0483301KLF3 (BMW).*  
<sup>1</sup> *The name DRB1\*1211 was officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in December 2004. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report [2], names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

*Human Immunology* 66, 1254–1257 (2005)  
© American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2006.  
Published by Elsevier Inc.

### MATERIALS AND METHODS

#### HLA Typing Methods

The blood sample originated from a 50-year old male Caucasian Czech potential bone marrow donor from the Czech National Marrow Donors Registry. The initial serological HLA class I typing of this donor was performed on DILEN trays provided by a local Czech supplier. Generic two-digit DRB1-DNA typing was done by sequence-specific primed polymerase chain reaction

0198-8859/05/\$-see front matter  
doi:10.1016/j.humimm.2005.05.002

### **3 Výběr z dalších publikací s problematikou imunopatologie transplantací krevetvorných buněk a solidních orgánů od r. 2007**

**3.8** Lysák D, Kořístek Z, Gašová Z, Skoumalová I, Jindra P Efficacy and safety of peripheral blood stem cell collection in elderly donors: does age interfere? J Clin Apher 2010 epub ahead of print  
**IF 1,682**

**3.9** Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, Jindra P, Vidan-Jeras B, Faber E, Pretnar J, Indrak K, Petrek M. Association of IL6 and CCL2 gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2009 Aug;44(4): 227-35  
**IF 2,998**

**3.10** Little AM, Jindra P, Raffoux C. Strategies for new donor typing based on donor HLA type or donor characteristics. Tissue Antigens. 2007 Apr; 69 Suppl 1:8-9. Review.  
**IF 2,33**

**3.11** Reischig T, Jindra P, Svecová M, Kormunda S, Opatrný K Jr, Treska V. The impact of cytomegalovirus disease and asymptomatic infection on acute renal allograft rejection. J Clin Virol. 2006 Jun; 36(2):146-51.  
**IF 3,124**

## Efficacy and Safety of Peripheral Blood Stem Cell Collection in Elderly Donors; Does Age Interfere?

Daniel Lysák,<sup>1\*</sup> Zdeněk Kořístek,<sup>2</sup> Zdeňka Gašová,<sup>3</sup> Iva Skoumalová,<sup>4</sup> and Pavel Jindra<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology and Oncology, University Hospital in Pilsen, Pilsen, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine—Hematooncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Hemato-Oncology, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

<sup>5</sup>Czech National Marrow Donor Registry (CS-2), Pilsen, Czech Republic

Elderly patients with hematological malignancies are often reliant on allogeneic transplantations. Older family relatives are increasingly involved in utilization as PBSC donors. We analyzed the mobilization results from 103 donors of age  $\geq 55$  years in comparison with 121 younger donors of age  $< 55$  years. The median CD34+ count in peripheral blood on day +5 of the mobilization was higher in younger than in older donor group (72.0 vs. 37.0 cells/ $\mu$ L,  $P < 0.0001$ ). Linear regression showed a negative correlation between the age and CD34+ count in peripheral blood ( $P < 0.0001$ ) and apheresis product ( $P < 0.0001$ ). Based on multivariate analysis, the amount of circulating CD34+ cells appeared to be negatively influenced by age ( $P < 0.001$ ) and positively by the pre-apheresis WBC count ( $P < 0.001$ ). The precollection CD34+ ( $P < 0.0001$ ), PLT ( $P = 0.0144$ ) counts, and age ( $P = 0.0392$ ) were confirmed as independent factors determining the collection yield. The side effects of G-CSF administration were similar in both the groups. Apheresis complications were more frequently recorded in elderly donors (29 vs. 15%,  $P = 0.0096$ ). Higher age represents a risk factor for poorer mobilization results. A requirement for more than one apheresis in older donors occurs more frequently to obtain the adequate amount of CD34+ cells. Mobilization and collection procedures are associated with acceptable risks and complication rates in elderly donors. *J. Clin. Apheresis* 00:000–000, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** apheresis; age; donor; allogeneic; mobilization

### INTRODUCTION

The development of reduced intensity conditioning regimens and the improvement of supportive care have enabled elderly patients or patients with comorbid diseases to be treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The increasing age of patients undergoing stem cell transplantation implies that elderly relatives are more often acceptable for peripheral blood stem cell (PBSC) donation. The donor's age is one of the important non-HLA factors affecting the survival rates after transplantation. Younger unrelated donor can be superior to an elderly HLA matched sibling. However, clinical practice does not always permit such a choice among donors. Therefore, older siblings still remain "first line" donors for elderly patients being prepared for transplantation.

There is great interindividual variation in hematopoietic stem cell mobilization among healthy individuals. Some donors do not achieve the minimum dose of CD34+ cells recommended for transplantation. Unfortunately, no specific and independent characteristics allowing a prediction of the response to G-CSF in the individual donor are available. It has been reported

by several authors that the donor's age affects the yield of PBSC [1–4]. However, other reports did not confirm the independent influence of age on the efficacy of the mobilization and apheresis procedure [5–7]. The data about mobilization feasibility and safety in elderly donors still remain controversial and an optimal process of their selection and management has not been established. Limited information about a potential impact of elderly donors' health before collection on the safety of the apheresis procedure is hardly ever available as well. Indeed, elderly donors more frequently suffer from comorbidities, and therefore, safety and adverse effects of the collection should be considered.

Contract grant sponsor: Ministry of Health of the Czech Republic; Contract grant number: IGA NR/9268-3.

\*Correspondence to: Daniel Lysák, Department of Hematology and Oncology, Charles University in Prague, University Hospital in Pilsen, Alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic. E-mail: lysak@fptlzen.cz

Received 6 November 2009; Accepted 2 August 2010

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/jca.20269

© 2010 Wiley-Liss, Inc.



## ORIGINAL ARTICLE

# Association of *IL6* and *CCL2* gene polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation

Z. Ambruzova<sup>1,6</sup>, F. Mrazek<sup>1,6</sup>, L. Raida<sup>2</sup>, P. Jindra<sup>3</sup>, B. Vidan-Jeras<sup>4</sup>, E. Faber<sup>2</sup>, J. Pretnar<sup>5</sup>, K. Indrak<sup>2</sup> and M. Petrek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunogenomics, Department of Immunology, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic; <sup>2</sup>Department of Haemato-Oncology, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic; <sup>3</sup>Department of Haematology and Oncology, University Hospital, Pilsen, Czech Republic; <sup>4</sup>Tissue Typing Centre, Blood Transfusion Centre of Slovenia, Ljubljana, Slovenia and <sup>5</sup>Department of Haematology, University Medical Centre, Ljubljana, Slovenia

Various polymorphisms of non-HLA genes have recently been investigated as candidate risk factors in allogeneic haematopoietic SCT (aHSCT). Our study aimed at exploring possible associations of *IL6* and *CCL2* single nucleotide polymorphisms (SNP) with aHSCT outcome. A total of 166 HLA-identical aHSCT pairs recruited in were genotyped for *IL6* -174 G/C, *IL6* -597 G/A, *CCL2* -2518 A/G and *CCL2* -2076 A/T SNPs by PCR with sequence-specific primers (PCR-SSP). The association between *IL6* -174 GG genotype and increased risk of acute GVHD was found in whole study group ( $P=0.03$ ) and in the subgroup of related aHSCT ( $P=0.01$ ), association between *IL6* -597 GG genotype and the occurrence of acute GVHD was detected only in the related aHSCT pairs ( $P=0.02$ ). Furthermore, reduction in OS was revealed among recipients possessing *IL6* -174\*G allele in the group of related aHSCT pairs ( $P=0.04$ ). Presence of *CCL2* -2076 TT genotype was associated with decrease of OS ( $P=0.04$ ) and increase of TRM ( $P=0.02$ ) in patients transplanted by related donor. These results, in the context of previous findings, suggest that *IL6* gene polymorphisms may be associated with aHSCT outcome, particularly in patients transplanted from a related donor.

*Bone Marrow Transplantation* (2009) 44, 227–235; doi:10.1038/bmt.2009.16; published online 23 February 2009

**Keywords:** *IL-6*; *CCL2*; single nucleotide polymorphism; haematopoietic SCT; GVHD; OS

## Introduction

Allogeneic haematopoietic SCT (aHSCT) has evolved over the last 50 years to become an important therapeutic approach, routinely used in the treatment of haematological malignancies and also in many other non-malignant diseases.<sup>1</sup> However, although the overall outcome of aHSCT has dramatically improved in the past decade, it is still compromised by the development of serious post-transplant complications such as GVHD or infections resulting in significant TRM. Even with precise HLA matching between donor and recipient, other genetic factors (non-HLA polymorphisms) are thought to influence the outcome of transplantation.<sup>2,3</sup> In this regard, single nucleotide polymorphisms (SNP) of the genes for cytokines/chemokines and their receptors, minor histocompatibility Ag, genes for innate immunity and those associated with the metabolism of drugs have recently been studied for their possible association with aHSCT outcome, often with controversial results.<sup>4–6</sup>

Of non-HLA factors, cytokines are important candidates in searching for marker of GVHD. IL-6 is an important proinflammatory cytokine implicated in immune-mediated complications of aHSCT, especially GVHD. IL-6 production may be affected by functional SNP in the promoter region of the *IL6* gene at position -174 (G/C). Healthy donors possessing the G allele produce higher serum levels of IL-6.<sup>7</sup> *IL6* -174\*G allele in patient and/or donor has been found to be associated with the risk of development of acute or chronic GVHD in previous studies.<sup>8,9</sup>

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, systematic name *CCL2*) belongs to the subfamily of CC chemotactic cytokines (chemokines).<sup>10</sup> It attracts the mononuclear cells to the site of inflammation. In the aHSCT context, MCP-1 may potentiate migration of donor T cells during the activation phase of GVHD.<sup>11</sup> Several polymorphisms have been identified in the promoter region of *CCL2* gene, of which the polymorphisms -2518 G/A and -2076 A/T seem to have a functional effect at least *in vitro*.<sup>12</sup> In the context of organ transplantation, determination of *CCL2* overproduction was showed associated with significant deterioration of kidney graft

Correspondence: Dr M. Petrek, Laboratory of Immunogenomics, Department of Immunology, Palacky University and University Hospital Olomouc, IP Pavlova 6, Olomouc CZ-775 20, Czech Republic. E-mail: martin.petrek@fnol.cz

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work.  
Received 30 April 2008; revised 8 January 2009; accepted 11 January 2009; published online 23 February 2009.

## Strategies for new donor typing based on donor HLA type or donor characteristics

A.-M. Little<sup>1</sup>, P. Jindra<sup>2</sup> & C. Raffoux<sup>3</sup>

<sup>1</sup> The Anthony Nolan Trust (ANT), UK

<sup>2</sup> The Czech National Marrow Donors Registry (CNMDR), Czech Republic

<sup>3</sup> France Greffe de Moelle (FGM), France

### Correspondence

Ann-Margaret Little

The Anthony Nolan Trust (ANT) UK

Tel: 44 20 7284 8320

Fax: 44 20 7284 8301

e-mail: a.little@medsch.ucl.ac.uk

doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.758\_4.x

### Abstract

Registries of volunteer unrelated haematopoietic stem cell donors must make decisions on the procedures used to human leukocyte antigen type new donors based on various factors including available finances and donor diversity. This manuscript describes a comparison of new donor typing strategies for three European registries which was presented for discussion at the 14th International Histocompatibility Workshop.

The aim of this panel discussion was to obtain information on the strategies different registries have for optimisation of their donor human leukocyte antigen (HLA) typing based on donor characteristics. Three registries were represented on the panel: Anthony Nolan Trust (ANT; number of donors ( $n$ ) = 371,360); France Greffe de Moelle (FGM;  $n$  = 134,774) and Czech National Marrow Donors Registry (CNMDR;  $n$  = 29,794). All three registries currently type new donors for a minimum of HLA-A, B and DRB1 (although see comment on CNMDR below). ANT and FGM use DNA-based typing methods (sequence specific oligonucleotides, sequence specific primers and sequencing-based typing), whereas the CNMDR types new donors for HLA-A and B predominantly by serology (90%) with HLA-DRB1 and the remainder of HLA-A and -B by DNA methods. Five areas were addressed by the panel.

### How does race/ethnicity affect the Registry's HLA typing strategy?

Of the three registries only the ANT collects data on race/ethnicity, however, this does not affect the initial HLA typing strategy. All rare HLA types are confirmed by a second method regardless of the race/ethnicity. Discussion from the audience highlighted that the majority of people present who were involved in donor searches would prefer to have access to donor ethnicity. However, for some countries, e.g. France, this is not permitted by law.

### How does the age or sex of volunteers alter the Registry's HLA typing strategy?

The age and sex of donors do not influence the HLA typing strategy of the FGM Register; however, both the ANT and CNMDR had programmes for additional testing of subpopulations of new recruits. The ANT has undertaken 'projects' whereby additional HLA-C and DQB1 testing was performed on all male donors aged 30 years or younger. The CNMDR also performs additional testing on males under 35 years of age (HLA-C, two-digit testing; B\*35, \*44 and DRB1\*04, \*11, \*13 subtyping). Of interest, the two larger

**Table 1** Gender of donors on three registries\*

Register	Gender of donors on register		
	Male %	Female %	
ANT	All donors	42	58
	HLA-A, B, DR	50	50
CNMDR	HLA-A, B, C, DR, DQ	64	36
	All donors	54	46
FGM	HLA-A, B, DR	52	48
	All donors	39	61
	HLA-A, B, DR, DQ	36	64
	HLA-A, B, C, DR, DQ	61	39

\* ANT, The Anthony Nolan Trust (London, UK); CNMDR, Czech National Marrow Donors Registry (Pizen, Czech Republic); FGM, France Greffe de Moelle (Paris, France).

Short communication

## The impact of cytomegalovirus disease and asymptomatic infection on acute renal allograft rejection<sup>☆</sup>

Tomáš Reischig<sup>a,\*</sup>, Pavel Jindra<sup>b</sup>, Miroslava Švecová<sup>c</sup>, Stanislav Kormunda<sup>d</sup>,  
Karel Opatrný Jr.<sup>a</sup>, Vladislav Třeška<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Department of Internal Medicine I, Charles University School of Medicine and Teaching Hospital, Alej Svobody 80, 301 60 Pilsen, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Hemato-oncology, Charles University School of Medicine and Teaching Hospital, Alej Svobody 80, 301 60 Pilsen, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Virology, Charles University School of Medicine and Teaching Hospital, Alej Svobody 80, 301 60 Pilsen, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Social Medicine, Charles University School of Medicine and Teaching Hospital, Alej Svobody 80, 301 60 Pilsen, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Surgery, Charles University School of Medicine and Teaching Hospital, Alej Svobody 80, 301 60 Pilsen, Czech Republic

Received 26 August 2005; received in revised form 29 December 2005; accepted 12 January 2006

### Abstract

**Background:** Cytomegalovirus (CMV) disease is a risk factor for allograft rejection in renal transplant (RTx) recipients. However, the role of asymptomatic CMV infection remains controversial.

**Objectives:** To determine the impact of CMV disease and asymptomatic infection on biopsy-proven acute rejection (BPAR) during 12 months post-RTx.

**Study design:** A total of 106 consecutive RTx recipients at risk for CMV (donor and/or recipient CMV seropositive) were followed prospectively for 12 months post-RTx. CMV activity was monitored using nested PCR from whole blood. Three-month prophylaxis with valgacyclovir or ganciclovir was given to 94 patients. BPAR episodes were classified according to the Banff 97 criteria. Multivariate Cox proportional hazards model was used to estimate the effect of CMV disease, asymptomatic infection, and other covariates on BPAR.

**Results:** Asymptomatic CMV infection occurred in 23% of the patients and 10% developed CMV disease. The incidence of BPAR was 29%. CMV disease was an independent risk factor for BPAR (HR = 3.0,  $P = 0.014$ ), while asymptomatic CMV infection was not ( $P = 0.987$ ). In addition to CMV disease, expanded criteria donor and donor age were independent predictors for BPAR. In univariate analysis, valgacyclovir (HR = 0.26,  $P = 0.008$ ) decreased the risk of BPAR. A similar trend was observed with ganciclovir (HR = 0.42,  $P = 0.058$ ). Only valgacyclovir remained significant in multivariate analysis (HR = 0.18,  $P = 0.044$ ).

**Conclusions:** CMV disease, but not asymptomatic infection, is an independent risk factor for BPAR during the first 12 months post-RTx.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Cytomegalovirus; Rejection; Renal transplantation; Ganciclovir; Valgacyclovir

### 1. Introduction

Cytomegalovirus (CMV) disease in patients after renal transplantation (RTx) is usually not fatal, but remains a major source of morbidity and increased costs post-RTx (Lautenschlager, 2003). In addition to a variety of viral syn-

dromes, CMV has indirect effects, including increasing the incidence of allograft rejection (Ljungman et al., 2002). However, the association between CMV and acute rejection (AR) is complicated. In most cases, AR precedes CMV disease (Dickenmann et al., 2001; Nett et al., 2004). The increased risk for CMV disease is due not only to enhanced immunosuppression while managing AR, but also to release of cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  activating CMV from the stage of latency (Reinke et al., 1999). Also CMV provokes an immunostimulatory response with alloantigen stimulation (Borchers et al., 1999), which may explain the

<sup>☆</sup> Data presented at the American Transplant Congress, 21–25 May 2005, Seattle, Washington.

\* Corresponding author. Tel.: +420 37 7103650; fax: +420 37 7103506.  
E-mail address: reischig@fnplzen.cz (T. Reischig).

#### 4 Souhrn dalších publikací autora v impaktovaných či recenzovaných časopisech od r. 2000

1. **Jindra P.**, Koza V., Švojgrová M., Škopek P., Vozobulová V., Schützová M.: Frontline transplantation of autologous CD34+ selected blood cells for advanced mantle cell lymphoma: no evidence of long-term cure: a single centre experience. *Bone Marrow Transplantation* 26, 2000, s. 1138-1139.
2. Rokyta R, Novak I, Matejovic M, Sramek V, Hora P, **Jindra P**: Hemaphagocytic syndrome in the critically ill. *Intensive Care Med* (2000) 26:1712
3. Karas M., Černá K., Koza V., **Jindra P.**, Vozobulová V., Schützová M.: Alogenní transplantace kostní dřeně u pacientů s chronickou myeloidní leukémií v období 1991 – 1995 a 1996 – 1998. Zkušenosti Hematologicko-onkologického oddělení FN Plzeň. *Vnitřní lékařství* 47, 2001, Suppl., s. 34-39.
4. **Jindra P.**, Koza V., Karas M., Navrátilová J., Pittrová H., Kůsová J.: HLA-Cw\* shoda příjemce a dárce u molekulárně A, B, DR, DQ shodných nepříbuzných dárců kostní dřeně. *Transfuze dnes* 7, 2001, č. 4, s. 139-142
5. Lysák D., Koza V., **Jindra P.**, Vozobulová V., Schützová M., Fišer J., Černá K., Karas M., Škopek P., Švojgrová M., Vokurka S.: Allogeneic BMT in patients above 45 years of age: a single center experience. *Bone Marrow Transplantation* 27, 2001, 7, s. 723-726.
6. Reischig T, Opatrný K, Bouda M, Treska V, **Jindra P**, Svecova M: A randomized prospective controlled trial of oral ganciclovir versus oral valacyclovir for prophylaxis of cytomegalovirus disease after renal transplantation. *Tranpl Int* 2002, 15:, 615-622
7. Boudova L, Fakan F, Michal M, Dusek J, Curik R, Husek K, Voska L, Kolnik P, Mukensabl P, Hes O, **Jindra P**. Lymphoproliferative disease after transplantation *Cesk Patol.* 2002 Jan;38(1):24-32.
8. Šimková P., **Jindra P.**, Koza V., Černá K.: Sledování výskytu cytomegalovirové infekce u nemocných po alogenní transplantaci kostní dřeně pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a antigenémie. *Vnitř Lék* 48, 2002, 2, s. 120-124.
9. **Jindra P.**, Koza V., Boudová L., Vozobulová V., Černá K., Karas M., Lysák D., Švojgrová M.: Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder in CLL patients after treatment with fludarabine and cyclophosphamide followed by high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 31, 2003, s. 951-952.
10. **Jindra P**, Koza V, Lysák D, Vozobulová V, Steinerová K: Inefficiency of high-dose G-CSF alone as second mobilization

regiment in fludarabin-cyclophosphamide treated CLL patients who failed after chemotherapy and G-CSF. Bone Marrow Transplantation (2005), 35, 729-730

11. Reischig T., **Jindra P**, Mareš J., Čechura M., Švecová M., Hes O., Opatrný K. jr. And Třeška V. Valacyclovir for Cytomegalovirus Prophylaxis Reduces the Risk of Acute Renal Allograft Rejection. Transplantation 2005;79:317-324
12. Lysak D, Koza V, **Jindra P**, Factors affecting PBSC mobilization and collection in healthy donors. Transfus Apher Sci. 2005 Nov;33(3):275-83.
13. Lysak D, Koza V, Steinerova K, **Jindra P**, Vozobulova V, Schulzova M. Mobilization of peripheral blood stem cells in CLL patients after front-line fludarabine treatment. Ann Hematol. 2005 Jul;84(7):456-61
14. Reischig T, Opatrný K jr., Třeška V, Mareš J, **Jindra P**, Švecová M. Prospective comparison of Valacyclovir and Oral Ganciclovir for Prevention of Cytomegalovirus Disease in High-Risk Renal Transplant Patients. Kidney Blood Press Res 2005;28:218-225
15. Boudova L, Kazakov D, **Jindra P**, Sima R, Vaněček T, Kuntscher V, Vozobulova V, Bouda J and Michal M. Primary cutaneous histiocyte and neutrophil-rich CD30+ and CD56+ anaplastic large-cell lymphoma with prominent angioinvasion and nerve involvement in the forehead and scalp of an immunocompetent woman. J Cutan Pathol 2006;33,584-589
16. Koza V., Cetkovský P., Faber E. Hájek R., Indrák K., Ivašková E., Jebavý L., **Jindra P**., Kozák T., Mayer J., Sedláček P., Starý J., Trněný M., Vítek A., Vorlíček J., Žák P : Indikace k alogenním a autologním transplantacím krvetvorných buněk. Doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP a České onkologické společnosti ČLS JEP. Klinická onkologie, 19, č. 6, 2006, s. 310-316.
17. Vokurka S., Koza V., **Jindra P**., Steinerová K., Vozobulová V., Schützová M., Lysák D., Švojkrová M., Mohammad L., Karas M., Svoboda T.: Význam imunoterapie anti-CD20 rituximab a vysokodávkované chemoterapie s autologní transplantací periferních krvetvorných buněk v první linii léčby mantle cell lymfomu – zkušenosti centra. Transfúze a Hematologie dnes 12, č. 4, 2006, s. 240-243.
18. Mírka H, Ferda J, Ohlídálová K, Vokurka S, Karas M, **Jindra P**, Lysák D, Mukenšnabl P.: Význam HRCT v diagnostice invazivní plicní aspergillozy u nemocných s hematologickými malignitami. Čes. Radiol.,2006, roč. 60, č.6, s412-418
19. Boudová L., Kazakov D, **Jindra P**., Pizinger K., Šíma R., Vaněček T., Kuntscher V., Vozobulová V., Mukenšnabl P., Michal M.: Primární kožní velkobuněčný anaplastický T-lymfom s koexpresí CD 30 a CD56, bohatý na neutrofile a histiocyty.



Popis raritního případu s přehledem literatury. *Klinická Onkologie* 2007, 20, 260-263

20. **Jindra P**, Ambrůzová Z, Mrázek F, Pittrová H, Navrátilová J, Steinerová K, Koza V. Výsledky konfirmačních HLA typizací dárců jako indikátor kvality HLA typizace dárců českého Národního Registru Dárců Dřeně (ČNRDD). *Trans. Hemat. dnes*, 13, 2007, No.3, 142-148
21. Mírka H, Ferda J, Ohlídalová K, **Jindra P**, Karas M, Lysák D, Vokurka S. Možnosti HRCT v diagnostice plicní formy chronické reakce štěpu proti hostiteli. *Ces Radiol* 2007;61(4): 387-391 (ISSN 1210-7883)
22. Reischig T, **Jindra P**, Hes O, Svecova M, Klaboch J. Třeška V. Valacyclovir Prophylaxis Versus Preemptive Valganciclovir Therapy to Prevent Cytomegalovirus Disease After Renal Transplantation. *American Journal of Transplantation* 2008; 8: 69–77
23. Vokurka S, **Jindra P**, Koza V, Steinerová K, Lysák D, Bystřická E, Novák L. Vyhledávání příbuzenského dárce krvetvorných buněk – koordinace procesu a výsledky jednoho centra. *Transfuze Hematol. dnes*, 14, 2008, No. 4, p.
24. **P. Jindra**. 2009-rok zásadních změn ve WHO nomenklatuře HLA systému. *Transfuze Hematol.dnes*,15,2009, 6-8
25. Vokurka S, Koza V, Jindra P, Karas M, V, Steinerová K, Lysák D, Schutzová M, Svoboda T, Vozobulová V, Švojkrová M, Mohammadová L, Jungová A, Hrabětová M. Alogenní transplantace krvetvorných buněk u pacientů s mnohočetným myelomem - zkušenosti centra. *Transfuze Hematol. dnes*, 15, 2009, No. 4, p.244-250
26. Reischig T., **Jindra P.**, Hes O., Bouda M., Kormunda S., Treska V.. Effect of cytomegalovirus viremia on subclinical rejection or interstitial fibrosis and tubular atrophy in protocol biopsy at 3 months in renal allograft recipients managed by preemptive therapy or antiviral prophylaxis. *Transplantation*. 2009, 87(3): 436-444.
27. Reischig T, Němcová J, Vaněček T, **Jindra P**, Hes O, Bouda M, Třeška V: Intra-graft cytomegalovirus infection: a randomized trial of valacyclovir prophylaxis versus pre-emptive therapy in renal transplantation. *Antiviral Therapy* 2010,15:23-30