

**Universita Karlova v Praze, Lékařská Fakulta v Plzni
Šiklův patologicko anatomický ústav**



Obor: Patologie

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

Autoreferát doktorské dizertační práce

MUDr. Pavel Jindra

Plzeň 2011

Dizertační práce byla zpracována v rámci kombinované formy doktorandského studijního programu na Šiklově patologicko-anatomickém ústavu LF UK v Plzni v letech 2008-2011.

Uchazeč: **Pavel Jindra, MUDr.**
Hematologicko-onkologické oddělení
Fakultní nemocnice v Plzni
Alej Svobody 80
Plzeň 304 60

Školitel: **Doc. MUDr. Ludmila Boudová, PhD.**
Šiklův patologicko-anatomický ústav
Lékařská fakulta v Plzni
Univerzita Karlova v Praze

Oponenti: **Prof. MUDr. František Fakan, Csc**
Šiklův patologicko-anatomický ústav LF UK v Plzni

MUDr. Antonij Slavčev, CsC.
Oddělení imunogenetiky,
Institut klinické a experimentální medicíny v Praze

Stanovisko k dizertační práci vypracoval vedoucí školícího pracoviště:
Prof. MUDr. Michal Michal, Šiklův patologicko anatomický ústav LF UK
v Plzni

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací
v oboru patologie se koná dne:

Místo obhajoby:
Šiklův patologicko-anatomický ústav, Dr. E. Beneše 13, Plzeň

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Prof. MUDr. Alena Skálová, CSc
předseda komise pro obhajobu dizertačních prací
v oboru patologie

OBSAH

Předmluva.....	4
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.....	5
1.1.1 KIR – killer immunoglobulin-like receptor- definice, funkce.....	5
1.1.2 Nomenklatura KIR.....	6
1.1.3 KIR geny – přehled a jejich HLA ligand.....	7
1.1.4 Genomická organizace KIR genů.....	8
1.1.5 Haplotypická variabilita KIR genů	9
1.1.6 HLA systém – základní principy.....	11
1.1.6.1 Funkce HLA systému.....	11
1.1.6.2 Funkční a strukturální rozdělení HLA antigenů.....	11
1.1.6.3 HLA molekuly – genetická organizace a struktura.....	12
1.1.6.4 Polymorfismus HLA.....	13
1.1.6.5 Dědičnost HLA systému.....	14
1.1.7 KIR a HLA – vzájemná interakce, souhrn.....	15
1.1.8 Teoretické východisko práce - populační genetika KIR v závislosti na HLA genotypu, možné implikace pro transplantace krvetvorných buněk.....	17
1.1.8.1 Populační genetika KIR v závislosti na HLA genotypu.....	17
1.1.8.2 Implikace pro transplantace krvetvorných buněk.....	18
1.2 Cíle práce.....	19
1.3 Materiál a metodika.....	20
1.3.1 Studovaná populace, výběr jedinců.....	20
1.3.2 HLA typizace.....	21
1.3.3 KIR genotypizace.....	21
1.3.4 Stanovení a definice KIR genotypů, statistické zhodnocení	21
1.4 Výsledky.....	22
1.4.1 KIR geny.....	22
1.4.2 KIR-HLA ligand kontext.....	24
1.4.3 KIR genotypy.....	26
1.5 Diskuze.....	29
1.6 Závěr.....	33
1.7 Summary.....	34
1.8 Seznam použité literatury.....	35
2 Publikované nové objevené alely či genomické aberace alel HLA systému	38
3 Výběr z dalších publikací se vztahem k tématu disertační práce od r. 2007.....	38
4 Příloha – vědecká, vzdělávací a publikační aktivita autora.....	39
4.1 Souhrn dalších publikací autora v impaktovaných či recenzovaných časopisech od r. 2000.....	39
4.2 Abstrakta v zahraničních časopisech s IF od r. 2006.....	41
4.3 Abstrakta v tuzemských časopisech.....	42

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. Studie byla publikována v časopise *Tissue Antigens* 2010, 76 (3), 240-244, IF 2.33

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 laboratoři 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. V autoreferátu jsou zmíněny pouze odkazy na tyto práce

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. Opět uvedeny pouze názvy těchto prací.

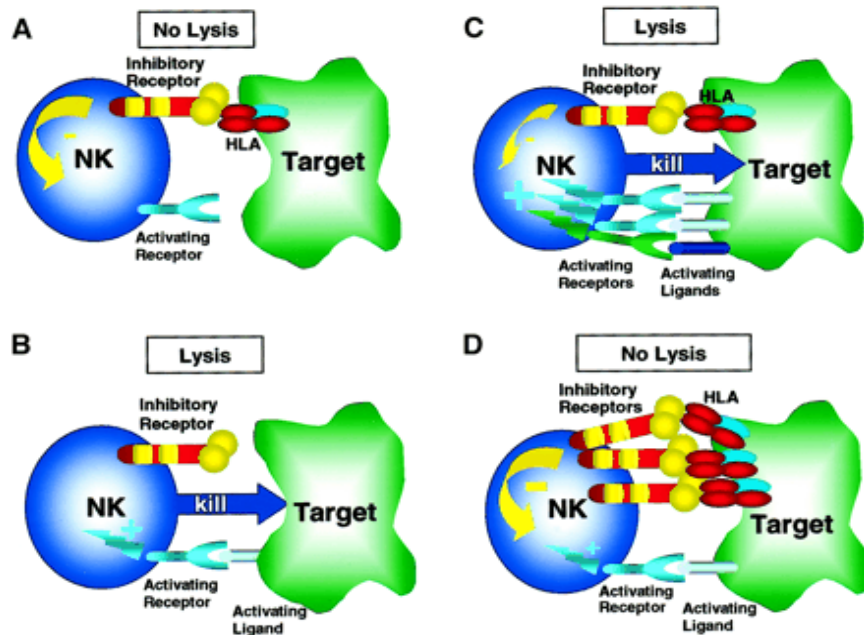
Příloha pak poskytuje přehled publikační a přednáškové aktivity autora v oblastech mimo přímou souvislost s tématem dizertační práce

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 (Killer Immunoglobulin-like Receptors), jsou receptory na povrchu NK (natural killers) buněk. NK buněk jsou podskupinou periferních lymfocytů s unikátní funkcí ve vrozené imunitní odpovědi. Jsou to 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), jmenovitě HLA I. třídy. Ty rozpoznávají prostřednictvím KIR a schopnost destruovat cílové buňky je právě dána vzájemnou interakcí mezi KIR receptory a příslušnou specifickou HLA molekulou na povrchu buněk, neboli ligandem KIR receptorů (2). Zjednodušený princip interakce mezi oběma typy KIR receptorů a HLA molekulou ukazuje obrázek 1 (3).

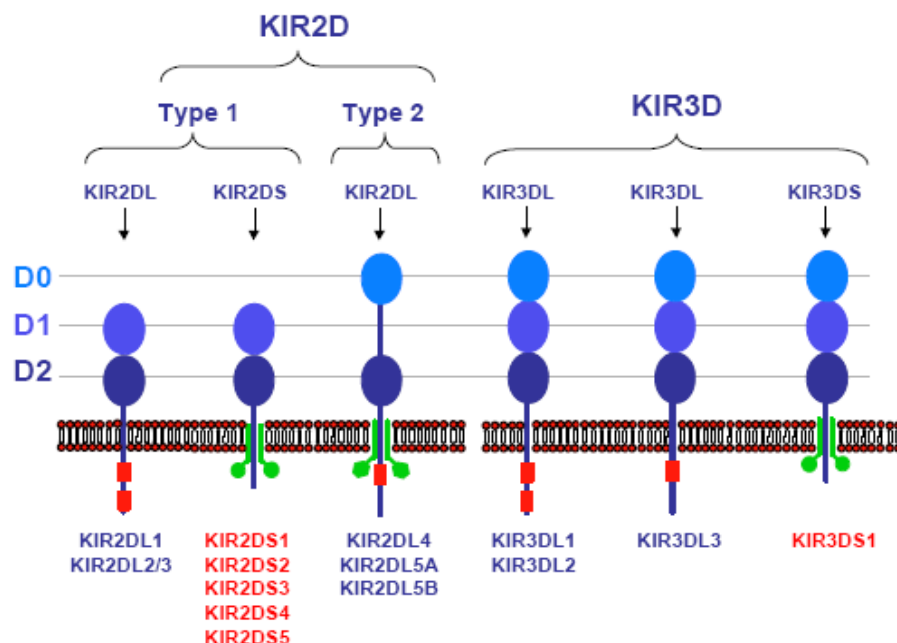


Obrázek 1: Regulace odpovědi NK buňky prostřednictvím interakce aktivačních/inhibičních KIR receptorů a HLA molekuly. Za normálních okolností inhibiční signál převládá nad aktivačním. Převzato z Farag et al., Blood 2002, 100: st. 1937

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/receptorů KIR vychází ze struktury molekuly receptoru, respektive z počtu „Ig-like“ domén a délky cytoplasmatického výběžku (tail) – viz obr. 2 (převzato z www.ebi.ac.uk/lpd/kir). KIR receptory mají buď 2 nebo 3



imunoglobulinové domény (2D nebo 3D) a buď dlouhý (L) nebo krátký (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. Jejich přehled spolu s funkcí 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	

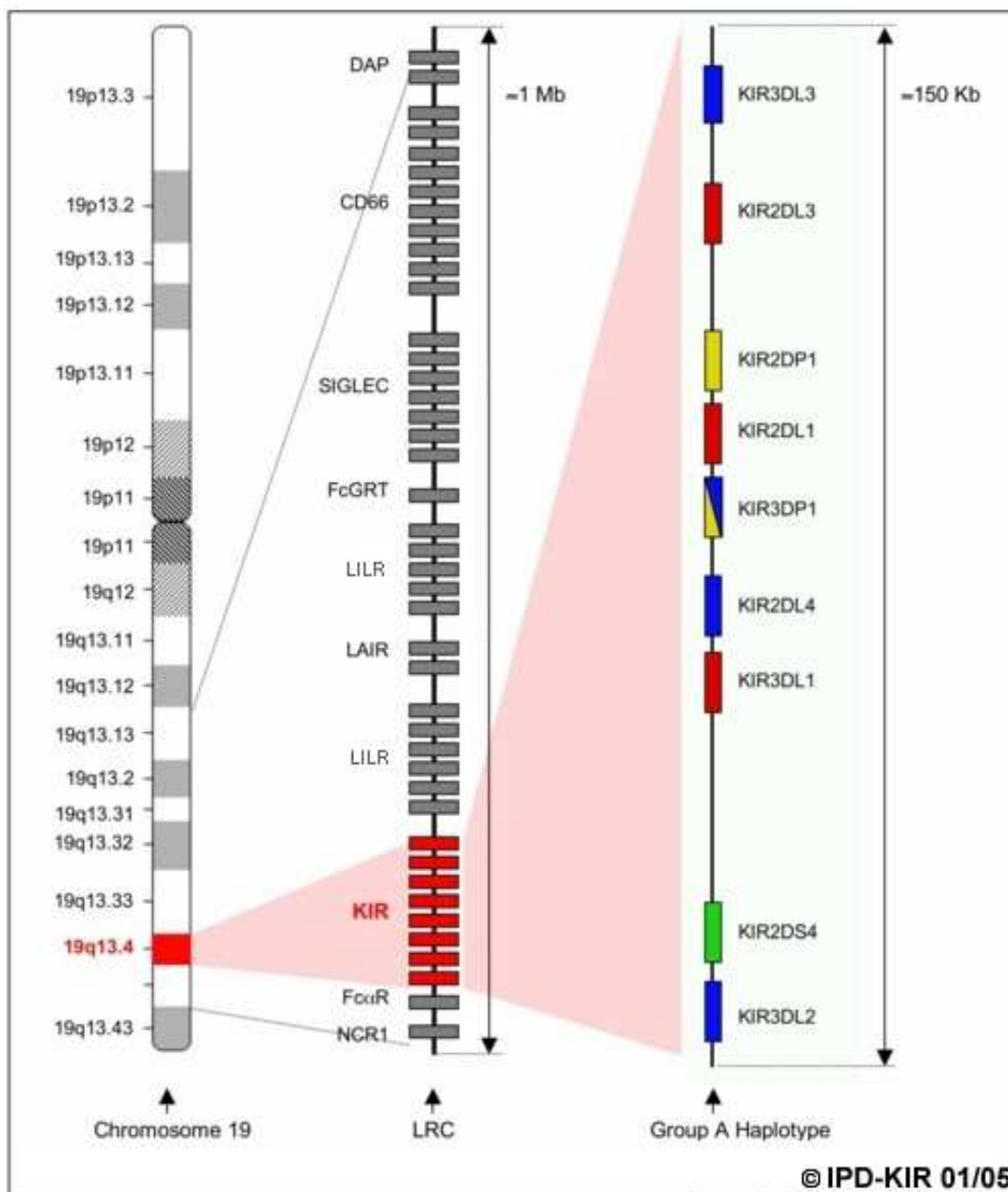
Tabulka 1: KIR geny&receptory jejich vazební partneři (ligandy)

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

Vazební partneři KIR (jejich ligandy) jsou známy především pro inhibiční receptory a vždy jde o HLA specifický I. třídy. Jedná se především o skupinu alel HLA-C alel lišících se aminokyselinovým reziduem na pozicích 77 a 80 α – helixu molekuly HLA-C (7).

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).

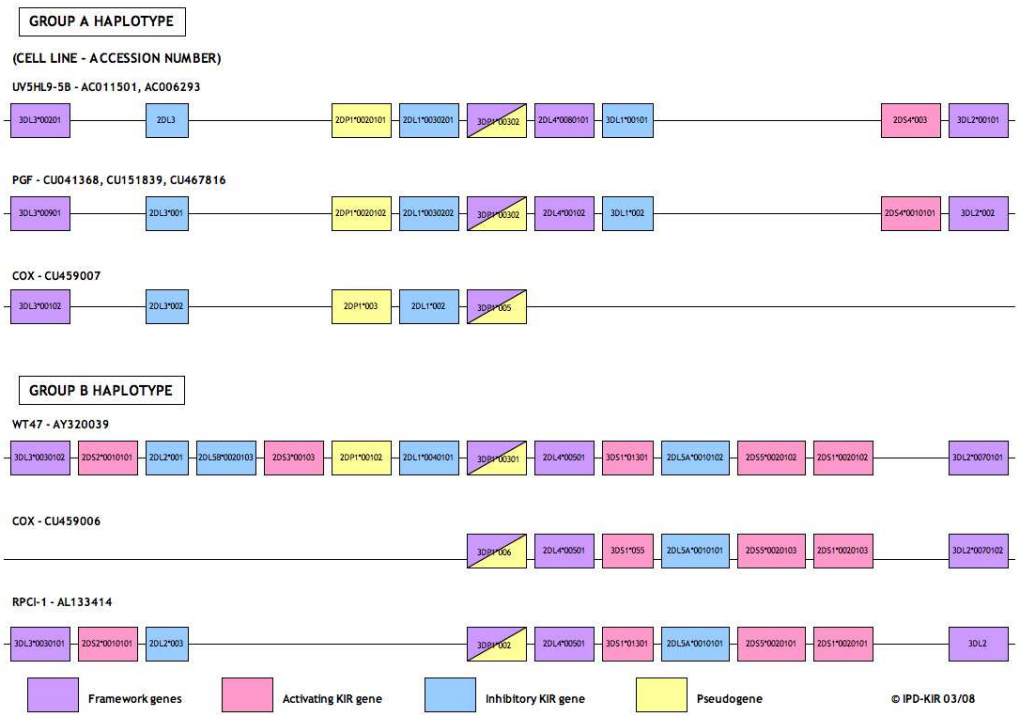


Obrázek 3: Genomická organizace KIR genů (převzato z Robinson et al., 8)

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. 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, 13), přičemž nové jsou neustále popisovány.



Obrázek 4: Příklad typických KIR haplotypů skupiny A a skupiny B, převzato z 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). U lidí je obvykle označujeme jako geny HLA (Human Leukocyte Antigen) systému, nutno však 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. 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).. 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).

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. Další rozdíl je v expresi, kdy molekuly I. třídy jsou přítomny prakticky na všech buňkách, přestože s různou expresí v různých tkáních, zatímco exprese molekul II. třídy je omezena pouze na povrch B-lymfocytů, aktivovaných T-lymfocytů, 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 o celkovém obsahu asi 140 genů. Nejbližší centromery je region II. třídy, který obsahuje geny pro α a β řetězce molekul HLA II. třídy a naopak nejbližší telomery je region I. třídy, který obsahuje geny pro těžké α 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 α) a stresové proteiny (hsp).

✓ 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 α - řetězce molekul HLA I. třídy (viz výše), které jsou klasickými sérologickými specificitami I. třídy a prezentují antigenní fragmenty CD8+ T-lymfocytům.

✓ 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 as 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), přičemž každý měsíc jsou popisovány desítky nových alel! Pro podrobnější a aktuální statistiku odkazují na adresu 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 popsanych sekvenčních motivů. 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

Všechny geny kódující HLA molekuly jsou kodominantní, řídí se mendelovským typem dědičnosti a dědí se 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. Rodinné studie ukázaly, že pro některé regiony (HLA-B k HLA-C a HLA-DQB1 k DRB1) uvnitř HLA komplexu je relativní absence rekombinací obzvláště typická. 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 HLA alelami . Populačně genetické studie prokázaly, že vazebná nerovnováha je dokonce typickým rysem HLA systému. Mezi pravděpodobné příčiny patří již uváděná redukovaná 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 haplotypem AH8.1** (viz též dále 1.1.8).

1.1.7 KIR a HLA – vzájemné interakce, souhrn

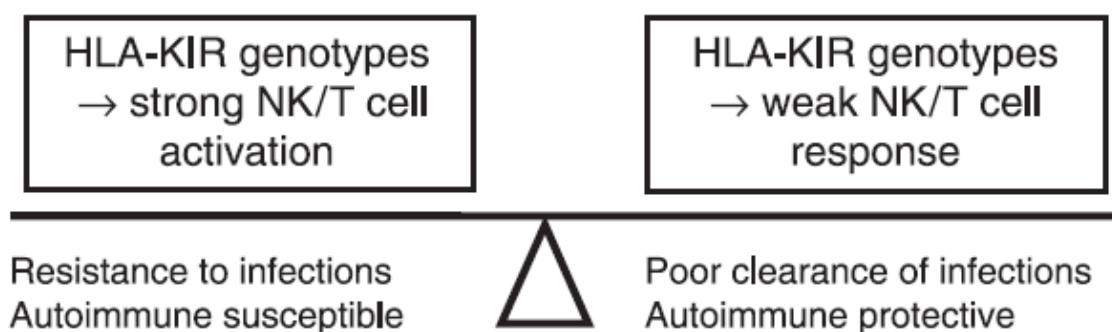
KIR a HLA vzájemnou interakcí kontrolují efektorové buňky a tím společně modulují vrozenou a získanou imunitu. Oba systémy mají řadu společných rysů: jsou kódovány v genomických regionech s velmi komplexní organizací, vykazují mimořádnou diverzitu jak uvnitř, tak mezi jednotlivými lidskými populacemi. Tato diverzita vznikla jako důsledek snahy účinně eliminovat neustále se měnící spektrum patogenů. Zatímco pro efektorové buňky získané imunity (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 kombinaci 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 autoimunních 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 5 (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 dosud uvedeného je zřejmé, že funkční různorodost přirozené imunitní odpovědi kontrolované 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) včetně české (30). Nicméně podle našich vědomostí nebyla dosud publikována žádná studie, která by analyzovala diverzitu genotypů a repertoár genů KIR u nejfrekventnějšího MHC haplotypu indoevropské populace – tj. 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 %). Jejich prevalence je pravděpodobně 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 vedoucí k expanzi a selekci specifického uniformního HLA haplotypu, nemohly podobně ovlivnit a deformovat i KIR genotyp? Jinými slovy, je repertoár KIR 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 (soubor selektovaný na základě definovaného HLA genotypu. Příkladem může být skupina jedinců homozygotních na AH8.1 haplotyp. Podrobná analýza genotypů a repertoáru genů KIR u takovéto skupiny by teoreticky mohla přispět k objasnění 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 systému 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) je kromě stupně HLA shody ovlivněn i interakcí KIR/HLA dárce a příjemce a také i repertoárem genů a genotypu KIR dárce (32-35). Podle některých studií může být vyšší počet KIR genů příznivým faktorem výsledku HCT (33,34) a typ KIR genotypu příjemce by mohl být jedním z kritérií výběru nepříbuzného dárce je-li k dispozici více HLA shodných nepříbuzných dárců. Nicméně reálně je obvykle počet perfektně HLA shodných dárců limitovaný na 1-2 a selekce dle kompozice KIR 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 µl plné periferní krve odebrané pro rutinní HLA typizaci při registraci dárce. Použita byla výhradně kolonková metoda (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™SSP, Norsko).

1.3.3 KIR genotypizace

Pro KIR genotypizaci byla použita také metodika PCR-SSP a to opět s pomocí komerčního kitu – Olerup™ KIR Genotyping Kit (Olerup™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

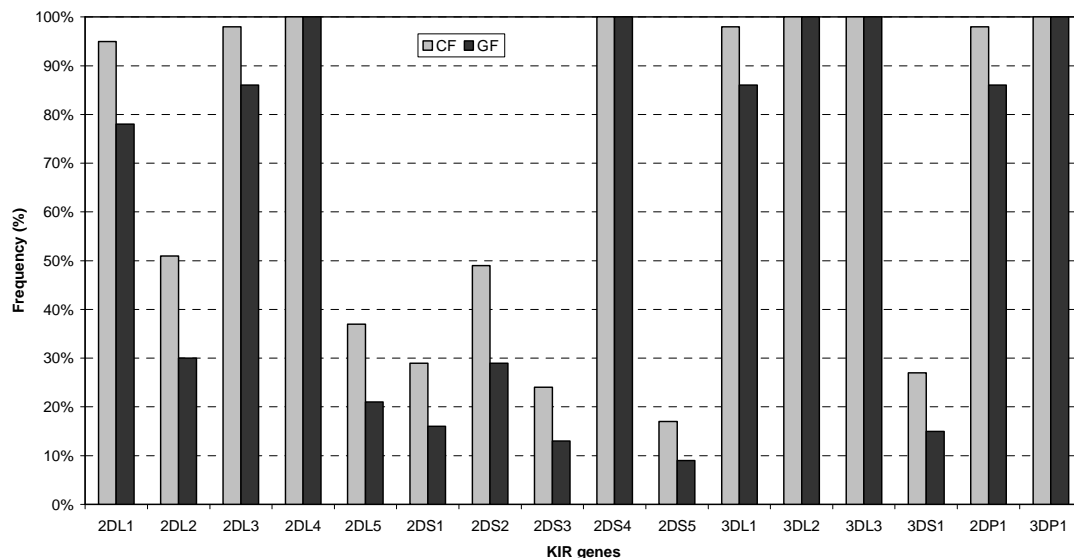
Definice KIR haplotypů A a B, stejně jako genotypové kombinace haplotypů (AA, AB nebo BB) byly odvozeny z typu a počtu zastoupených KIR genů (10). Frekvence nositelů specifických KIR genů (CF) byly stanoveny jednoduchým přímým spočítáním. Vlastní genové frekvence KIR genů (GF) byly kalkulovány použitím 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 individuí 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
KIR2DL2/3	C1 (Ser77,Asn80)	41	100%
2DL2pos/2DL3neg		1	2.4%
2DL2pos/2DL3pos		20	48.8%
2DL2neg/DL3pos		20	48.8%
KIR2DL1	C2 (Asn77,Lys80)	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, přísne „HLA genotypicky selektované“ skupině s dosud popsány genotypy v databázi genotypů KIR (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.

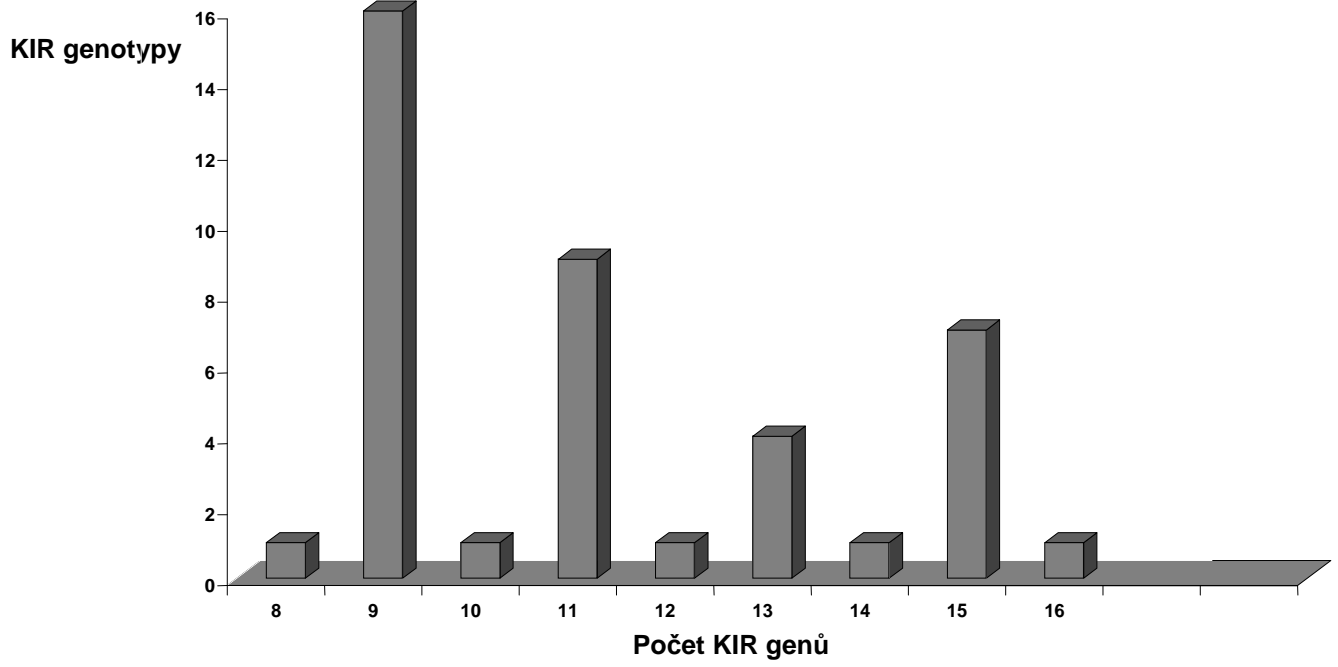
Jak již bylo zmíněno výše, 8 z těchto 16 jedinců s AA genotypem mělo deleční variantu KIR2DS4 genu (alely 2DS4*003/004/006) a tito jedinci tedy měli velmi malou pravděpodobnost exprese jakéhokoliv funkčního aktivačního genu KIR na povrchu buněk. Tudíž pro 19,5 % naší populace byla charakteristická absence 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 genotypch 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 ⁽³⁰⁾ (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) 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. 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. Summary

The genetic diversity of KIR genes and genotypes resembles of the HLA. Although the genes encoding KIR and HLA are located in different chromosomes and segregate independently, 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 typed for KIR genes. Over all, fourteen different genotypes were identified. The observed frequencies of KIR genes and genotypes composition generally mirror the published frequencies in Caucasians. Non-framework genes with frequency of more than 90 % included KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR2DS4 and KIR2DP1. Except for the 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. 22 individuals (54 %) had a copy of KIR haplotype A and B (AB genotype), whereas 3 (7%) were homozygous for B (BB genotype). Nine of 14 reported genotypes occurred only in one individual. Comparing with published and recorded genotypes (www.allelefreqencies.net), 5 genotypes were reported in less than 20 individuals worldwide and one genotype was reported so far only once. On the other hand, the three most frequent genotypes account for 68 % of all detected genotypes. The results do not show any alteration in the KIR repertoire. Instead we demonstrate the well-preserved and unrestricted KIR diversity in this HLA uniform group.

1.8. 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: 331: 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

2 Publikované nové objevené alely či genomické aberace alel HLA systému

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 v impaktovaných časopisech se vztahem k tématu disertační práce od r. 2006

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 Příloha – vědecká, vzdělávací a publikační aktivita autora

4.1 Souhrn publikací autora v impaktovaných či recenzovaných časopisech od r. 2000 (mimo práce výše uvedené)

- 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. *Transfúze 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, Mukensnabl P, Hes O, **Jindra P**, .Lymphoproliferative disease after transplantation] *Cesk Patol.* 2002 Jan;38(1):24-32. Czech.
- 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 fludarabine-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 Patiens. *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., Švojgrová 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. *Transfuze 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 aspergilozy 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, Ohlídálová 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, Schützová M, Svoboda T, Vozobulová V, Švojgrová 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., Třeška 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: Intragraft cytomegalovirus infection: a randomized trial of valacyclovir prophylaxis versus pre-emptive therapy in renal transplantation. *Antiviral Therapy* 2010,15:23-30

4.2 Abstrakta v zahraničních časopisech s IF od r. 2006 (pouze jako hlavní autor)

1. P. Jindra, J. Muzik, K. Indrak, V. Koza, K. Chroust, F. al Sabty, M. Karas: Does the younger age of an unrelated donor compensate for the higher immune incompatibility? An analysis of 76 allografted patients aged above 50 years from the Czech Acute Leukaemia Clinical Register (ALERT), *Tissue Antigens*, 73, p.397-402
2. P.Jindra, P. Venigová, V. Koza, J. Navrátilová, H. Pittrová. Analysis of KIR gene diversity of the A1B8DR3 (AH8.1) haplotype in the Czech National Marrow Donors Registry (CNMDR) donors: The scenario for the donor selection according to the KIR repertoire? *Tissue Antigens*, 73, p.484, P183
3. **Jindra P.**, Muzik J., Indrak K., Koza V., Karas M., Chroust K., Al Sabty F., Demeckova E., Cetkovsky P., Jungova A., Zak P.: Unrelated and related HSCT in elderly AML patients: is young matched unrelated donor comparable or superior to older sibling donor? An analysis of 76 allografted patients aged above 50 years from the Czech Acute Leukaemia Clinical Register (ALERT), *Bone Marrow Transplantation* 43, S1, 2009, s. S96.
4. **Jindra P.**, Venigova P., Koza V., Navratilova J., Steinerova K., Pittrova H.: Could donor selection according the KIR repertoire be feasible? Analysis of KIR genes diversity of the HLA haplotype A1B8DR3 (AH 8.1): Study on Czech National Marrow Donors Registry., *Bone Marrow Transplantation* 43, S1, 2009, s. S292.
5. **P.Jindra**, V. Koza, M. Karas, P. Venigová Unrelated stem cell transplantation in haematological patients above 50 years: equivalent outcome with fully (10/10) matched and mismatched (8-9/10) donors. *Tissue Antigens*, Volume 71, Issue 4, Page 265-398, Apr 2008
6. **P.Jindra**, V. Koza, M. Karas, K. Steinerová Unrelated HSCT in high/intermediate risk haematological patients above 50 years: comparable outcomes both with fully molecularly (10/10) matched and mismatched (8-9/10) donors. *Bone Marrow Transplant*, Volume 41, Issue S1 (March 2008)
7. **Jindra P**, Venigova P, Koza V. KIR gene content of the ancestral haplotype A1B8DR3: study on Czech national Marrow Donors Registry donors and patients homozygous for A1B8DR3. *Tissue Antigens* 2007: 69(5),s 438, P-091,
8. **Jindra P**, Koza V, Steinerova K, Karvunidis T. Does the younger age of an unrelated donor compensate for the higher immune incompatibility? Outcome analysis of the patients above 55 years transplanted with reduced intensity conditioning (RIC) using either siblings or unrelated donors. *Tissue Antigens* 2007: 69(5) ,s 513, P-291,
9. **Jindra P**, Koza V, Steinerova K, Karas M. Analysis of RIC allografted patients over 55: young unrelated donor and older sibling have comparable outcomes. *Bone Marrow Transplantation* 39, Suppl. 1, 2007, S136.
10. **Jindra P.**, Koza V., Pittrova H., Navratilova J., Mrazek F., Ambruzova Z: Confirmatory typing results as an indicator of quality of the HLA typing of the donor pool: Czech National Marrow Donor Registry experience. *Bone Marrow Transplantation* 35, Suppl. 2, 2005, S128-S129.
11. **Jindra P.**, Koza V., Steinerova K., Lysák D., Karas M., Vozobulova V., Vokurka S.: Comparison of early outcome of CLL patients allotransplanted with conventional or reduced-intensity conditioning: age is no longer a barrier when using reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplantation* 35, Suppl. 2, 2005, S234.
12. **Jindra P.**, Koza V., Steinerova K., Lysak D., Vozobulova V., Schutzova M., Karas M., Svojkrova M.: Comparison of outcome of peripheral T-cell lymphoma, unspecified versus T-anaplastic large cell lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation: could this bring the survival curves closer together? *Bone Marrow Transplantation* 35, Suppl. 2, 2005, S245

- více než 15 přednášek(abstrakt) jako spoluautor

4.3 Abstrakta v tuzemských časopisech

Od roku 2000 prezentováno > 30 přednášek na národních akcích jako hlavní autor či spoluautor