

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Ondřej Pelák

Výzkum účinné antivirové imunity po transplantaci
Research of protective immunity on patients after transplantation

Diplomová práce

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

Praha, 2012

Prohlášení

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

V Praze 6. 5. 2012

.....
Bc. Ondřej Pelák

Poděkování

Rád bych zde poděkoval hlavně svému školiteli Doc. MUDr. Tomáši Kalinovi, Ph.D. za jeho trpělivé a obětavé vedení při experimentální práci i během vlastního sepsání diplomové práce, cenné rady a připomínky a stále milý přístup. Dále bych zde rád poděkoval MUDr. Ladislavu Królovi, za pomoc při provádění experimentů.

Dále bych rád poděkoval kolektivu laboratoře CLIP cytometrie pod nímž jsem tuto práci vypracoval, především Mgr. Veronice Kanderové, Mgr. Janu Stuchlému a MUDr. Ester Mejstříkové Ph.D., dále pak Doc. MUDr. Ondřeji Hrušákovi Ph.D., Mgr. Karlu Fišerovi Ph.D., Danielu Thürnerovi, Pavlu Semerákovi, Aleně Hrdličkové a Pavle Luknárové za pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Luce a mé rodině za podporu.

ABSTRAKT

Deplece imunitních funkcí po transplantaci hematopoetických kmenových buněk vede u pacientů ke zvýšené náchylnosti k různým oportunistickým infekcím. Obzvláště pak reaktivace cytomegaloviru (CMV) může způsobovat život ohrožující infekce a vyžaduje protivirovou léčbu. V této práci sledujeme a porovnáváme výsledky specifické stimulace CMV antigeny na CD4⁺ a CD8⁺ T-buňkách u 63 pacientů po HSCT. Díky použití průtokové mnohobarevné cytometrii, jsme byli schopni detekovat zároveň míru exprese CD154 (CD40L), intracelulárních cytokinů (INF- γ a IL-2) a znaku degranulace (CD107a), a stanovit tak funkční status různých typů T-lymfocytů. Zjistili jsme, že duální produkce INF- γ a IL-2 na CD8⁺ T-lymfocytech se vyskytuje u pacientů, kteří CMV reaktivaci kontrolují, zatímco u nekontrolujících pacientů se tato populace nevyskytuje. CD8⁺ T-buňky produkující pouze INF- γ byly početně zastoupeny v největší míře, ale představují spíše neprotektivní paměťové buňky. Dále jsme vyvinuly dva funkční testy NK-buněk. Jeden, který se zaměřuje na detekci jejich degranulace a druhý detekující cytotoxickou schopnost NK-buněk.

Klíčová slova: transplantace, hematopoetické kmenové buňky, T-lymfocyty, obnova imunity, cytomegalovirus, INF- γ , IL-2

ABSTRACT

Depletion of immune functions in patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) results in higher frequencies of several types of opportunistic infections. Especially the reactivation of human cytomegalovirus (CMV) may cause life-threatening infections and require antiviral treatment. Within this diploma thesis we compare the function signatures of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells stimulated by CMV antigens, which were obtained from 63 patients after HSCT. Polychromatic flow cytometry measurements of CD154 (CD40L), intracellular cytokines (INF- γ and IL-2) and marker of degranulation (CD107a) allowed us to determine the function status of various T-cells simultaneously. We have discovered, that dual production of INF- γ and IL-2 on CD8⁺ T-cells was present only in patients controlling their CMV reactivations, but was absent in noncontrollers. Single production of INF- γ on CD8⁺ T-cells was the most abundant subtype, but they most probably represent non-protective memory cells. We have further created two tests of NK-cells functionality, one that aims on the detection of their degranulation ability and second, that detects cytotoxic capability of NK-cells.

Key words: transplantation, hematopoietic stem cells, T-lymphocytes, immune system recovery, cytomegalovirus, INF- γ , IL-2

SEZNAM ZKRATEK

A488	Fluorochrom alexa fluor 488
ADA	Adenosindeamináza
ADA deficit	Deficit adenosindeaminázy
AID	Aktivačně-indukovaná deamináza
AIDS	Syndrom získaného selhání imunity (z angl. <i>acquired immune deficiency syndrome</i>)
AML	Akutní myeloidní leukémie
APC	Fluorochrom allofykokyamin
BC	Krevní preparát (z angl. <i>buffy coat</i>)
BCECF	2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5- (a -6)-karboxyfluoresceinu
BLNK	B-buněčný linker protein (z angl. <i>B-cell linker protein</i>)
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumin</i>)
BTK	Brutonova tyrosin kináza
CD	Diferenciační skupina (z angl. <i>cluster of differentiation</i>)
CLIP	Výzkum dětských leukemií (z angl. <i>Childhood leukaemia investigation Prague</i>)
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMV	Lidský cytomegalovirus
CVID	Běžná variabilní imunodeficience (z angl. <i>common variable immunodeficiency</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EBV	Epstein-Barrové virus
ECD	Fluorochrom phycoerythrin-texas red
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	S enzymem spojená imunosorbentní esej (z angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ELISPOT	S enzymem spojená imunosorbentní bodová esej (z angl. <i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i>)
FBS	Fetální hovězí sérum
FHL	Familiární hemofagocytující lymfohistiocytóza

FITC	Fluorochrom fluorescein isothiokyanát
FSC	Forward Scatter
GvHD	Reakce štěpu proti hostiteli (z angl. <i>graft versus host disease</i>)
HIGM	Hyper IgM syndrom
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA	Lidské leukocytární antigeny (z angl. <i>human leukocyte antigens</i>)
HLA DR	Lidský leukocytární povrchový receptor II. Třídy (z angl. <i>II. class human leukocyte antigen</i>)
HSCT	Transplantace hematopoetických kmenových buněk (z angl. <i>hematopoetic stem cell transplantation</i>)
HV-500	Fluorochrom horizon V500
ICS	Intracelulární značení cytokinů (z angl. <i>intracellular cytokine staining</i>)
IgA	Imunoglobulin A
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
Ig α	Imunoglobulinový koreceptor α
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
ISH	<i>In situ</i> hybridizace
KIR	Imunoglobulínu podobný receptor na NK-buňkách (z angl. <i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>)
LAD syndrom	Deficit leukocytární adheze (z angl. <i>Leukocyte adhesion deficite syndrome</i>)
LDA	Limitní ředění (z angl. <i>limiting dilution</i>)
LYST	Regulátor lysosomální dopravy (z angl. <i>lysosomal trafficking regulator</i>)
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex (z angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Nepřekládaná RNA (z angl. <i>messenger RNA</i>)
NK-buňka	Přirozená zabijácká buňka (z angl. <i>natural killer-cell</i>)

PB	Fluorochrom pacific blue
PBS	Fosfátový pufr
PC7	Fluorochrom phycoerythrin cyanin 7
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Fluorochrom phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Fluorochrom peridinin chlorofyl protein – cyanin 5.5
PI	Propidium jodid
PID	Primární imunodeficiencie
PK	Periferní krev
PNP deficit	Deficit purinnukleosidfosforylázy
pre-BCR	pre-B buněčný receptor (z angl. <i>pre-B-cell receptor</i>)
PS	Fosfatidylserin
RQ-PCR	Real-time kvantitativní PCR (z angl. <i>real-time quantitative PCR</i>)
RT-PCR	Real-time PCR
SCID	Těžké kombinované imunodeficiencie (z angl. <i>severe combined immunodeficiency disease</i>)
SHM	Somatické hypermutace
SSC	Side Scatter
TAC	Tetramerní protilátkový komplex (z angl. <i>tetrameric antibody complex</i>)
Tc	Cytotoxické T-lymfocyty
TCD	T-buněčně ochuzený (z angl. <i>T-cell depleted</i>)
Th1/2 lymfocyty	T pomocné 1/2 lymfocyty (z angl. <i>T-helper 1/2 cells</i>)
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α (z angl. <i>tumor necrosis faktor-α</i>)

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Srovnání metod, využívaných k detekci cytokinů (převzato od Pala et al. (2000))

Tabulka 2: Seznam protilátek a dalších fluorochromů, používaných v prováděných experimentech

Tabulka 3: Základní charakteristiky zdravých dárců

Tabulka 4: Vybrané charakteristiky pacientů zahrnutých do statistické analýzy

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Primární B-buněčné deficity. Z hematopoetických kmenových buněk (HSC) vznikají pluripotentní progenitorové buňky, které se dále diferencují do myeloidních nebo lymfoidních progenitorů (LP). LP se dále vyvíjejí do T-, NK- a B-lymfocytů. Vývoj B-lymfocytů je zjednodušen do stádií pro-B, pre-B a B-buněk. Spodní tabulka ukazuje funkční spojitost mezi produkcí protilátek a konkrétním PID onemocnění. ^a někteří pacienti s deficitem CD40L mají detekovatelné IgA, nejspíše produkované nezávisle na CD40 dráze; SL, náhražkový lehký řetězec; AICDA Δ C, delece v C-koncovém řetězci AICDA; A. R., autosomálně recesivní; XLA, X-vázaná agammaglobulinémie; CVID, běžná variabilní imunodeficience; N, normální. Převzato z Fischer (2004).
- Obr. 2: Obnova leukocytárních podskupin. Všechny osy x ukazují dny po transplantaci. Jsou ukázány mediány pacientů (diamanty) a 25-75 percentil (chybové přímký). Normální hodnoty mediány zobrazují přerušované přímký (u neutrofilů chybí). Silná linie ukazují normální 5-95 percentil. Předtransplantační vyšetření jsou obecně ukázána jako den -100. Převzato od Storek et al. (2004).
- Obr. 3: Ukázka variability mezi fluorochromy, (A) ukazuje větší intenzitu značení CD19 pomocí APC Alexa 750 oproti APC H7, (B) ukazuje menší nespecifickou vazbu protilátky CD3 s fluorochromem APC Alexa 750 proti APC H7.
- Obr. 4: Příklad výběru subpopulací, (A) výběr jednotlivých buněk s odstraněním dubletů, (B) výběr lymfocytů, (C) výběr CD3⁺ lymfocytů.
- Obr. 5: Příklad výběru NK-buněk.
- Obr. 6: Příklad výběru buněk K562.
- Obr. 7: Klasifikační strom. Pomocí C4.5 algoritmu jsme rozdělili proměnné, podle jejich nejvyšších vypovídacích hodnot. Nahoře jsou nejsignifikantnější proměnné a směrem dolů se jejich vypovídací hodnota postupně snižuje. R, příjemce, D, dárce, uvedená čísla odpovídají hraničním procentuálním výskytům jednotlivých populací pro rozřazení do dalších skupin.

- Obr. 8: Příklad výsledků stimulace CMV antigeny u zdravých (A) seropozitivních, (B) seronegativních pacientů.
- Obr. 9: Rozdíly v expresi jednotlivých znaků na CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocytech u (A) CMV-CR, (B) CMV-NC pacienta.
- Obr. 10: Rozdíly v produkci na CD8⁺ T-lymfocytech u CMV-NC a CMV-CR pacientů (A) duální INF- γ + a IL2+ (B) INF- γ +, na ose y jsou vynesena procenta výskytu na CD8⁺ T-lymfocytech, * značí p-hodnotu < 0,05.
- Obr. 11: Procentuální zastoupení INF- γ + CD154+ CD4⁺ T-lymfocytů u CMV-NC a CMV-CR pacientů.
- Obr. 12: Ukázka obnovy specifické T-lymfocytární odpovědi v časových bodech D28+, D56+, D90+ a D180+ po transplantaci, přičemž každý řádek tabulky znázorňuje jeden časový bod.
- Obr. 13: Vývoj specifické odpovědi v časových bodech po transplantaci, srovnání mezi CMV-NC a CMV-CR pacienty. Na ose y jsou vynesena procenta výskytu INF- γ a IL-2 na CD8⁺ T-lymfocytech.
- Obr. 14: Porovnání celkové produkce INF- γ , IL-2, CD154 a CD107a u CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů mezi CMV-NC a CMV-RC pacienty.
- Obr. 15: Výsledek degranulačního testu. A a B ukazují výsledek u pacienta s poruchou degranulace. (A) nestimulovaná jamka, (B) stimulovaná jamka. C a D ukazují výsledek u kontroly prováděné simultánně s vyšetřovaným pacientem. (C) nestimulovaná jamka, (D) stimulovaná jamka. Pacient má 7,41 krát sníženou schopnost degranulace oproti kontrole.
- Obr. 16: Optimalizace testu cytotoxicity, (A, B) nedetekovatelné rozdíly umírání buněk K562 v prvních krocích vývoje testu, (C) detekovatelná změna mezi stimulovanou a nestimulovanou jamkou.

OBSAH

1. ÚVOD	2
1.1. Imunitní systém	3
1.1.1. Imunitní systém a antivirová odpověď	3
1.2. Imunodeficity.....	5
1.2.1. Primární imunodeficity.....	5
1.2.2. Získané imunodeficity	10
1.2.3. Terapie imunodeficitů	11
1.3. Imunodeficiency po transplantaci kmenových buněk.....	12
1.3.1. Komplikace po HSCT	12
1.3.2. Role CMV po HSCT	13
1.4. Rekonstituce imunitních funkcí po HSCT.....	14
1.4.1. T buňky.....	15
1.4.2. B buňky	18
1.4.3. Fagocyty a antigen prezentující buňky (APC)	19
1.4.4. NK-buňky	19
1.5. Možnosti testování imunitních funkcí člověka.....	20
1.5.1. Detekce specifických T-lymfocytů u pacientů po HSCT	22
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	23
3. METODIKA	24
3.1. Zpracování buněk	24
3.2. Izolace lymfocytů z periferní krve (PK), nebo krevního preparátu („buffy coat“, BC) pomocí centrifugace s využitím hustotního gradientu Ficoll-Hypaque.....	25
3.3. Průtoková cytometrie a cytometrická analýza	26
3.4. Optimalizace cytometrického experimentu	27
3.5. Rekonstituce funkční imunity po transplantaci hematopoetických kmenových buněk	30
3.5.1. Pacienti	30
3.5.2. Monitorování CMV virové nálože	31
3.6. Stimulace antigeny.....	31
3.7. Metoda ICS.....	32
3.8. Statistická analýza	35
3.9. Měření degranulace NK-buněk.....	36
3.10. Stanovení cytotoxicity NK-buněk	37
4. VÝSLEDKY	40
4.1. Rekonstituce imunitních funkcí	40
4.2. Charakteristika pacientů	40
4.3. Proměnné kontrolující CMV reaktivaci.....	41
4.4. Ověření funkčnosti testování T-lymfocytů	42
4.5. Obnova imunitních funkcí v časových bodech po transplantaci.....	47
4.6. Degranulační test	50
4.7. Cytotoxický test	53
5. DISKUZE	54
5.1. Obnova T-lymfocytů	54
5.2. Degranulace	56
5.3. Cytotoxicita.....	57
6. ZÁVĚR	58
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

1. ÚVOD

Transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) je efektivní léčebná metoda, která umožňuje léčbu mnoha různých hematologických poruch. Příprava na HSCT má za úkol připravit, nebo alespoň silně přinutit hematopoézu v příjemci k poskytnutí volného prostoru pro přihojení dárcovského štěpu a zároveň potlačit imunitní systém příjemce, aby nedošlo k odmítnutí štěpu. V období, kdy už pacientův původní imunitní systém není funkční a zároveň ještě nedošlo k plnému obnovení imunitního systému z dárcovských hematopoetických kmenových buněk, je příjemce ohrožen celou řadou infekcí různého původu.

Tato diplomová práce pojednává o obnově imunitního systému po HSCT, což je v současné době velmi diskutované téma. Práce se zaměřuje zejména na obnovu CMV specifické T-buněčné odpovědi, díky které je pacient chráněn před rozvojem život ohrožující CMV nemoci. CMV infekce u zdravých osob probíhá pouze s minimálními příznaky, ovšem u imunokompromitovaných pacientů po HSCT je jednou z hlavních příčin morbidity a mortality.

Cílem této diplomové práce je výzkum obnovy funkčních odpovědí na T-lymfocytech u pacientů, kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně. Práce se zaměřuje na sledování funkční odpovědi po stimulaci CMV antigeny a tuto odpověď porovnává mezi pacienty, kteří kontrolují a nekontrolují CMV reaktivaci. Dále porovnává funkční odpověď na T-lymfocytech u pacientů v jednotlivých časových bodech a snaží se najít takový časový bod po transplantaci, kdy už dochází u většiny pacientů k obnovení funkční odpovědi na T-lymfocytech. V rámci diplomové práce se také zabývám přípravou dvou funkčních testů NK-buněk. Jedná se o test degranulace a o test cytotoxicity NK-buněk. Tyto testy jsme vyvíjeli za účelem rozšíření již používaných ukazatelů na některé genetické poruchy NK-buněk, abychom mohli přesněji stanovit, o jakou genovou poruchu se jedná.

1.1. Imunitní systém

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává neznámé antigeny a chrání tak organismus proti škodlivinám zevního i vnitřního původu. Tato funkce se projevuje jako:

1. Obranyschopnost, kdy imunitní systém rozpoznává vnější škodliviny a chrání organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům.
2. Autotolerance – v tomto případě imunitní systém rozpoznává vlastní tkáň organismu a udržuje toleranci vůči nim.
3. Imunitní dohled, což je stav, kdy imunitní systém rozpoznává vnitřní škodliviny a průběžně je odstraňuje. Jedná se zejména o staré, poškozené nebo mutované buňky.

Pokud je některá složka imunitního systému poškozena může to mít za následek značné problémy a nezřídka i smrt.

Fyziologická imunitní odpověď je výsledkem souhry nespecifických a antigenně specifických mechanismů. Proti některým antigenům se více uplatňují nespecifické mechanismy, ať již buněčné, nebo humorální. Viry, plísňe a nitrobuněční parazité vyvolávají převážně imunitní odpovědi zprostředkované buňkami, zatímco proti extracelulárním bakteriím a mnohobuněčným organismům se uplatňují spíše složky humorálního imunitního systému ve spolupráci s výkonnými složkami nespecifické imunity, jako jsou fagocyty (neutrofilů, eosinofilů), komplement a NK-buňky. Velmi důležité jsou na všech úrovních mnohočetné regulační mechanismy, které odpověď optimalizují a minimalizují imunopatologické reakce nezbytně provázející většinu účinných imunitních reakcí. Od počátku je tedy imunitní reakce pečlivě regulována, aby byl její výsledek úměrný vyvolávajícímu podnětu (Jonuleit et al. 2003).

1.1.1. Imunitní systém a antivirová odpověď

První linii obrany proti virům představují antigenně nespecifické mechanismy, zvláště pak interferony a NK-buňky. Interferony- α a - β , jejichž produkce se indukuje v infikovaných

buňkách, inhibují replikaci viru a v dosud neinfikovaných buňkách navozují antivirový stav, který brání rozvoji infekce. Infikované makrofágy produkují silný aktivátor NK-buněk, IL-12. Aktivované NK-buňky mohou napadat jiné infikované buňky a ničit je jakožto potenciální zdroj další infekce (Brown et al. 2001).

V obraně proti cytopatickým virům se nejvíce uplatňují protilátky, které brání infekci dalších buněk. Na sliznicích mají význam především sekreční protilátky IgA, které blokuje adhezi virů na mukózní epitel. Tento mechanismus je důležitý zejména v obraně proti respiračním virům a enterovirům. Pokud viry proniknou do oběhu, uplatňují se neutralizační protilátky typu IgG, nebo IgM. Ty také aktivují klasickou cestu komplementu, který je schopen svým membranolytickým komplexem lyzovat některé druhy virů. Při protilátkové odpovědi proti virům se využívají stejné mechanismy jako u extracelulárních bakterií – tj. spolupráce Th2 lymfocytů a B-buněk. Protilátky vzniklé při virové infekci (doplňované aktivací paměťových lymfocytů) mají preventivní efekt na sekundární infekci, kdy mohou zabránit adhezenci virů na slizniční povrchy, nebo neutralizovat viry vniklé do oběhu (neutralizační protilátky-influenza). Pro jedince s protilátkovými imunodeficiencemi mohou být některé virové infekce, zejména echovirové, fatální (Ferrari et al. 2001).

Velký význam mají cytotoxické T lymfocyty (Tc), jejichž proliferace a diferenciaci se stimuluje po rozeznání fragmentů virových proteinů asociovaných s MHC glykoproteiny I. Efektorové Tc v přímém kontaktu ničí infikované buňky jako potenciální zdroj další infekce. Některé cytokiny produkované Tc však přispívají k potlačení virové infekce také tím, že necytotoxicky inhibují replikaci virů (TNF- α , INF- γ) (Appay et al. 2002).

Některé viry se po infekci integrují do hostitelského genomu, kde mohou perzistovat po léta v latentní formě. Za různých okolností, zejména v případě lokálního nebo systémového potlačení obranných mechanismů hostitele, se mohou reaktivovat a způsobovat různé další choroby: např. virus Varicelly se může reaktivovat v nervových gangliích za vzniku pásového oparu, virus EBV se může aktivovat u imunodeficientních jedinců a přispívat k malignitám hematopoetického systému.

Pro zásadní úlohu buněčné imunity v obraně proti virům svědčí to, že těmito infekcemi jsou ohroženi zejména jedinci s imunodeficiencemi T-lymfocytů a s kombinovanými

poruchami imunity. Zvýšená náchylnost k infekcím herpetickými viry byla popsána u jedinců s dysfunkcí NK-buněk.

1.2. Imunodeficiency

Imunodeficiency je porucha, při které je imunitní odpověď omezená, či úplně chybí. Imunitní systém chrání tělo od potenciálně nebezpečných antigenů, jako jsou mikroorganismy, toxiny, rakovinné buňky, nebo tkáně od jiných jedinců. Imunitní odpověď zahrnuje odpověď bílých krvinek, které se skládají z neutrofilů a lymfocytů. Neutrofilové fagocytují a pohlcují cizorodý materiál. Lymfocyty se rozdělují do dvou skupin, T-lymfocyty a B-lymfocyty. T-lymfocyty jsou součástí buněčné imunity, zatímco B-lymfocyty produkují protilátky, které jsou součástí humorální imunity. Vyprodukované protilátky se vážou na antigen a tím umožňují jeho efektivnější zničení, pomocí fagocytů, nebo komplementových proteinů. Imunodeficiency mohou být znakem chyby jedné nebo více částí imunitního systému a rozdělují se na:

1. primární imunodeficiency (PID), které jsou způsobeny vrozenými poruchami imunitního systému
2. získané imunodeficiency (sekundární), které jsou způsobeny nemocemi, které postihují imunitní systém (např. infekce virem HIV), nebo jinými vnějšími vlivy (např. cytotoxickou léčbou či ozářeními), které ovlivňují imunitní systém

1.2.1. Primární imunodeficiency

Primární imunodeficiency (PID) zahrnují více než 100 popsáných existujících jednotek (Chapel et al. 2003). Tyto nemoci způsobují defekty imunitní odpovědi na nejrůznějších úrovních. Klinicky se tyto defekty projevují velice proměnlivě a to od náchylnosti k mikrobiálním infekcím přes alergie až k lymfoproliferacím či projevům autoimunit. Zkoumání vrozených imunodeficiencí vedlo v mnoha případech k identifikaci nových genů, které jsou klíčové ve vývoji, v efektorových funkcích imunitních buněk, nebo přispívají k homeostatickým mechanismům bránícím k rozvoji autoimunitních

onemocnění. Primární imunodeficity se dají rozdělit do několika skupin, podle toho, která část imunitního systému je nefunkční (Stiehm et al. 2004).

1. B-buněčné deficity

Příklady B-lymfocytárních defektů produkce protilátek zahrnují x-vázanou agammaglobulinemii, hypogammaglobulinemii (CVID), selektivní IgA deficit, méně častý hyper IgM syndrom (HIGM) a deficity protilátek podskupiny IgG. Při x-vázané agammaglobulinemii se netvoří žádné protilátky, což má za následek vážné infekce a často smrt. CVID se projevuje snížením hladiny jedné nebo více specifických protilátek (IgA, IgG, IgM). Tento deficit obvykle způsobuje opakované mírné respirační infekce.

2. T-buněčné deficity

Vrozené vady postihující T-lymfocyty mohou způsobovat vyšší náchylnost k virovým a mykotickým infekcím. Příkladem je DiGeorge syndrom, který je způsoben delecí malé části na 22. chromozomu.

3. SCID

Kombinovaný vrozený imunodeficit postihuje T-lymfocyty i B-lymfocyty. Často bývá fatální během prvního roku života, protože není přítomna žádná ochrana proti infekcím.

4. Defektní fagocyty

Tento vrozený defekt fagocytů vede k infekcím, které jsou vážnější nebo častější, než bývá obvyklé, a mohou způsobovat hluboké abscesy. Tyto infekce často jen velmi omezeně odpovídají na léčbu standardními antibiotiky. Příklady této poruchy mohou být chronické granulomatické nemoci, nebo defekt adheze leukocytů.

5. Defekty komplementu

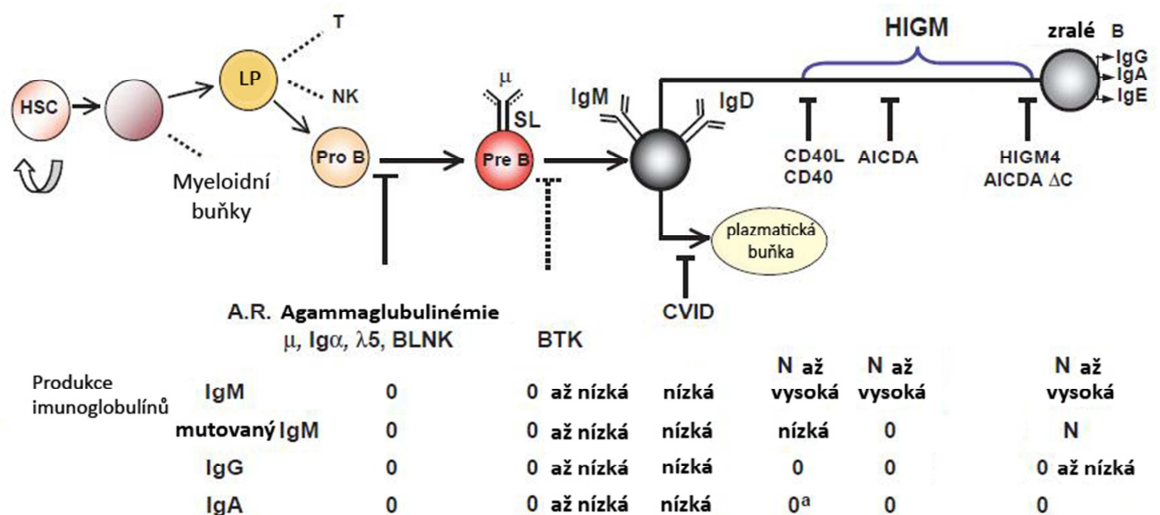
Poruchy ve funkci komplementu postihují 2% lidí s primárními imunodeficity. Některé komplementové deficity vedou ke stejným bakteriálním infekcím jako u protilátkových deficitů, jiné způsobují zvýšený výskyt infekcí mozkových blan (meningitis).

Vzhledem k tématu této diplomové práce se dále podrobněji zabývám pouze B-buněčnými deficity a kombinací T-buněčných deficitů se SCID, které způsobují defekty v lymfocytární cytotoxicitě.

B-buněčné deficity

B-buněčné primární imunodeficity mohou vznikat v časném stádiu vývoje B-lymfocytů, kdy dojde k bloku ve vývojovém stádiu pre-B buněk (Conley et al. 2000). Příkladem mohou být takové mutace, které brání signalizaci přes pre-B buněčný receptor (pre-BCR), což vede k nedostatku zralých B-buněk a nedochází tedy k produkci sérových imunoglobulinů. Deficity jak v těžkém řetězci μ , tak λ 5 části lehkého řetězce pre-B buněčného receptoru, ale i deficity v koreceptoru imunoglobulinu α ($Ig\alpha$), nebo v „downstream“ signalizačních komponentech jako jsou Brutonova tyrosin kináza (BTK) a adaptorový protein BLNK vedou k zadržení B-lymfocytů v pre-B buněčném stádiu vývoje (Conley et al. 2000).

Nedávný výzkum HIGM fenotypu, který charakterizuje defekt imunoglobulinového izotypového přesmyku, což vede ke snížené koncentraci sérových protilátek IgG, IgA, a IgE, poskytl neočekávané výsledky (Notarangelo & Hayward 2000). K izotypovému přesmyku je nezbytná interakce mezi B- a T-lymfocyty, aby došlo ke stejnému rozpoznání antigenu. Poprvé bylo jednoznačně prokázáno v roce 1993, že CD40 ligand (CD154) je nezbytný k vytvoření germinálního centra, kde dochází k izotypovému přesmyku v lymfoidních orgánech (Ferrari et al. 2001). Mutace v genu, které kódují molekulu CD40, byly nalezeny u několika pacientů, jejichž B-lymfocyty nebyly schopny provést izotypový přesmyk, což vedlo k potvrzení této teorie. Tyto mutace byly objeveny v genu *AICDA*, který je selektivně exprimován v B-buňkách v germinálních centrech a kóduje enzym aktivačně-indukovanou deaminázu (AID) (Muramatsu et al. 1999, Revy et al. 2000). B-lymfocyty takto postiženého pacienta nejenom, že nebyly schopny izotypového přesmyku, ale měly také poškozenou schopnost tvorby somatických hypermutací (SHM) ve variabilním segmentu imunoglobulinových genů, což bylo následně prokázáno pozorováním *Aicda*^{-/-} myšího modelu (Muramatsu et al. 2000). Tyto dva objevy byly významné a jednoznačně propojily tyto dvě somatické rekombinační události, u nichž bylo známo, že probíhají na stejném místě (v germinálních centrech) a v přibližně stejné době vývoje B-lymfocytů (Obr. 1).



Obr. 1: Primární B-buněčné deficity. Z hematopoetických kmenových buněk (HSC) vznikají pluripotentní progenitorové buňky, které se dále diferencují do myeloidních nebo lymfoidních progenitorů (LP). LP se dále vyvíjejí do T-, NK- a B-lymfocytů. Vývoj B-lymfocytů je zjednodušen do stádií pro-B, pre-B a B-buněk. Spodní tabulka ukazuje funkční spojitost mezi produkcí protilátek a konkrétním PID onemocněním. ^a někteří pacienti s deficitem CD40L mají detekovatelné IgA, nejspíše produkované nezávisle na CD40 dráze; SL, náhražkový lehký řetězec; AICDA Δ C, delece v C-koncovém řetězci AICDA; A. R., autosomálně recesivní; XLA, X-vázaná agammaglobulinémie; CVID, běžná variabilní imunodeficience; N, normální. Převzato z Fischer (2004).

Defekty v lymfocytární cytotoxicitě

Cytotoxická aktivita zprostředkovaná T- a NK-buňkami je klíčová při protivirové a protinádorové imunitě. Cytolytická granula obsahují efektorové molekuly cytotoxicity, které mohou být rozděleny do dvou skupin: 1. na perforinu závislou sekretorickou dráhu a na 2. dráhu interakcí Fas-Fas ligand. První skupina indukuje smrt cílové buňky po sekreci a endocytóze smrtících produktů (perforinu) cílovou buňkou (Catalfamo & Henkart 2003). Druhá skupina indukuje buněčnou smrt pomocí Fas receptoru, který je exprimován na plazmatické membráně a v citlivých buňkách způsobuje kaspázami zprostředkovanou buněčnou smrt (Nagata 1999). Genetické defekty obou těchto drah jsou známé a vedou k naprosto odlišným fenotypům.

Je známo několik onemocnění, která sdílejí defekt v T- a NK-buněčné na perforinu závislé cytotoxické odpovědi, jejich příkladem jsou familiární hemofagocytující lymfocytóza (FHL2 a 3), syndrom Griscelliho a syndrom Chediakův-Higashiho (de Saint Basile & Fischer 2001). Onemocnění, kdy aktivované makrofágy pohlcují krevní buňky, se nazývá hemofagocytární syndrom (Henter et al. 1998).

Defekty v cytotoxicitě jsou způsobeny buď defektem v perforinu (Stepp et al. 1999), nebo neschopností sekretorických cytolytických granulí projít exocytózou (Clark & Griffiths 2003, Feldmann et al. 2003). U Griscelliho syndromu byl popsán defekt v buněčném umístění granulí („docking“), který je způsoben deficitem v genu *RAB27* (Ménasché et al. 2000). Rab27 je malý GTP vazebný protein, který je asociován s cytolytickými granuly. Chediakův-Higashiho syndrom je spojen s deficitem v *LYST* (regulátor lysosomální dopravy (trafficking)), což je cytolytický protein, který se účastní štěpení granulí (Clark & Griffiths 2003). Tyto objevy ukazují, že jakkoliv jsou mechanismy na perforinu závislé cytolyze poškozené, dochází k trvalé expanzi a aktivaci CD 8 (a CD 4) T-buněk, ačkoliv si tyto buňky zachovávají schopnost podstoupit antigenem indukovanou buněčnou smrt (Fadeel et al. 1999). Proto je cytolyza důležitá v T-lymfocytární homeostázi po aktivaci antigenem. Je dobře známo, že stimulace antigenem, obzvláště pak virová infekce, stimuluje masivní expanzi CD8 T-buněčné populace (Van Parijs & Abbas 1998), která je vzápětí následována řízeným zmenšením této populace (Badovinac et al. 2002). Van Parijs & Abbas (1998) navrhli možnost, že odstranění antigen prezentujících buněk, ať už s nebo bez odstranění asociovaných cytokinů, vede k značnému snížení T-buněčné populace.

Zdánlivá absence autoimunitního projevu defektu, který je způsoben cytolytickými granuly, kontrastuje s tím, co můžeme vidět u pacientů postižených defektem v druhé cytotoxické dráze, která vede přes membránový receptor Fas (Rieux-Laucat et al. 1995, Fisher et al. 1995). Tomuto stavu se říká autoimunitní lymfoproliferativní syndrom a je spojen s polyklonální T- a B-buněčnou proliferací a akumulací dvojité pozitivních $\alpha\beta$ CD4 a CD8 buněk, které jsou anergické a mají proměnlivý autoimunitní projev. Autoimunitní projev je často zprostředkovan autoprotilátkami a je namířen proti krevním buňkám. Narušení Fas-zprostředkované apoptózy je způsoben mutacemi v genu, který kóduje Fas1 (*TNFRSF6*) (Rieux-Laucat et al. 1995, Fisher et al. 1995), a ve vzácnějších případech v genu pro kaspázu 10 (*CASP10*) (Wang et al. 1999). Tuto dráhu také ovlivňují dosud neznámé genetické defekty, protože závažnost lymfoproliferace, stejně tak jako závažnost lokalizace projevu autoimunity, jsou kontrolovány zatím neznámými modifikujícími geny.

Rozdíly mezi jednotlivými fenotypy obou modelů poškození lymfocytární cytotoxicity jsou tedy hlavně v jejich cílech. Na perforinu závislá cytotoxická dráha zasahuje hlavně po persistentní virové stimulaci, například infekcí herpetickými viry u lidí. Tento způsob regulace nutí k selektivnímu cílení paměťových T-buněk (Badovinac et al. 2003). Naopak

buněčná smrt Fas-závislá má za cíl autoimunitní klony v rámci naivních T- a B-lymfocytárních populací (Rathmell & Goodnow 1995).

1.2.2. Získané imunodeficity

Získané (sekundární) imunodeficity jsou mnohem běžnější než primární a vznikají vlivem nejrůznějších faktorů, které postihují hostitele s původně normálně fungujícím imunitním systémem. Mezi tyto faktory patří například infekční agens, působení různých léků, metabolické nemoci a různé vlivy okolního prostředí. Tyto imunitní deficity se klinicky projevují zvýšenou frekvencí neobvyklých komplikací během běžných infekcí, nebo výskytem oportunistických infekcí. Sekundární imunodeficity mají široké spektrum projevů, kdy záleží na typu a závažnosti etiologického faktoru a na náchylnosti hostitele. Například imunodeficit způsobený použitím kortikosteroidů záleží na použité dávce (Tan et al. 2006) a v menší míře na vývoji probíhající nemoci v pacientovi, jako je například přítomnost sepse (Annane et al. 2009). AIDS, který vzniká po infekci virem HIV, je nejvíce prozkoumaným sekundárním imunodeficitem, převážně díky své prevalenci a vysoké mortalitě pokud není léčen. Avšak celosvětově nejběžnější získaný imunodeficit vzniká vážnou podvýživou, která postihuje jak vrozenou, tak adaptivní imunitu (Black et al. 2008). Obnovení imunity u sekundárních imunodeficitů je obecně dosaženo zvládnutím primárního onemocnění, nebo odstraněním problematického agens.

Pro sekundární imunodeficity jsou typická velmi častá infekční onemocnění s heterogenní etiologií. V ekonomicky vyspělých zemích se na sekundárních imunodeficiencích podílejí významnou mírou iatrogenní zásahy – operace, ozařování, imunosupresivní terapie (po orgánových transplantacích či při autoimunitě), stavy po transplantaci kostní dřeně a cytostatická léčba při léčbě onkologických onemocnění. Ke zvýšené náchylnosti k infekcím vedou také poruchy přirozených bariér (popáleniny, poranění a toxická poškození kůže a sliznic, chronická zánětlivá onemocnění kůže a sliznic a polytraumata, popřípadě chirurgické zákroky).

1.2.3. Terapie imunodeficitů

Současná léčba imunodeficitů má dva cíle: 1. minimalizovat a kontrolovat infekci a 2. nahradit poškozené nebo úplně chybějící části imunitního systému pomocí adoptivního přenosu nebo transplantací. Pasivní imunizace gammaglobulinem je velmi prospěšná u pacientů trpících agammaglobulinémií a zároveň zachraňuje životy mnoha pacientům s X vázanou agammaglobulinémií (Berger 2008). Transplantace kostní dřeně je v současné době vhodnou léčbou pro mnoho imunodeficitních onemocnění a úspěšně se tímto postupem dají léčit pacienti se SCID syndromem, s Wiskott-Aldrichovým onemocněním a pacienti s “holými” lymfocyty (LAD syndrom). Nejúčinnější je transplantace pokud jsou z kostní dřeně pečlivě odstraněny všechny T-buňky a dodrženo HLA párování, tak aby nedošlo k reakci štěpu proti hostiteli. Terapie, při níž je nahrazen enzym u ADA a PNP deficitů, přináší dočasné klinické zlepšení u pacientů s autosomálním SCID onemocněním. U několika pacientů bylo také úspěšně zkušeno podání bovinního enzymu ADA konjugovaného s polyethylen glykolem, aby se prodloužila jeho doba života v séru, ovšem klinické zlepšení bylo pouze krátkodobé (Booth et al. 2007).

Teoreticky je cílem terapie vrozených imunodeficitů nahradit defektní gen v samoobnovitelných kmenových buňkách. Takové nahrazení genu zůstává v současnosti nedosažitelné pro mnoho lidských imunodeficitů. Hlavním problémem takové genetické terapie je obtížná purifikace kmenových buněk, které by byly vhodné pro nahrazení genu, a nedostatek metod, které by umožnily vkládání genů do buněk tak, aby výsledné buňky byly schopné delšího života a měly vysokou hladinu exprese. Malé množství pacientů s X vázaným SCID onemocněním bylo úspěšně transplantováno autologními buňkami kostní dřeně, které byly upraveny tak, aby exprimovaly gen pro γ_c řetězec. Avšak u několika takto léčených pacientů se vyvinula leukémie, nejspíše proto, že nový gen byl vložen do místa pro onkogen a tím byl aktivován (Woods et al. 2006). Z tohoto hlediska je budoucnost využití genetické léčby u tohoto onemocnění nejistá a dál se nejvíce využívají postupy založené na transplantaci kmenových buněk.

1.3. Imunodeficiencie po transplantaci kmenových buněk

Transplantace kmenových buněk krvetvorby je léčebnou metodou, jejímž účelem je nahradit abnormální nebo nefunkční krvetvorbu. Indikace k této léčbě se stále rozšiřují, a tak vzniká pro zdravotnickou péči zvětšující se skupina pacientů, kteří tuto léčbu absolvují. Jde o velmi náročnou terapeutickou metodu zejména z důvodu sekundární imunodeficiencie, neboť infekce stále představují nejčastější příčinu smrti nemocných podstupujících tuto léčbu.

Existují dva základní typy transplantace kmenových krvetvorných buněk (HSCT), a to autologní a alogenní (Seggewiss & Einsele 2010). V případě autologní transplantace jde o léčebný postup, při kterém se plánovaně odebírají vlastní kmenové buňky pacienta před léčebnými postupy, které mají za úkol zničit nádorové buňky, popřípadě vlastní imunitní buňky u autoimunitních onemocnění. Tento odběr je zároveň spojen v případě nádorových chorob s metodami čištění (purging) od nádorových buněk. Indikace k autologní transplantaci kostní dřeně jsou v současné době zejména hematologické malignity – lymfomy, plazmacytom a další onkologické choroby (neuroblastom aj.). U většiny leukémií jsou výsledky autologní transplantace špatné pro vysoké riziko relapsu. Autologní, a vzácněji i alogenní transplantace, je také stále častěji indikována u těžkých autoimunitních onemocnění (např. u sklerodermie, roztroušené sklerózy, lupusové glomerulonefritidy), pokud tato onemocnění nelze kontrolovat klasickou imunosupresivní léčbou.

Zdrojem kmenových buněk je kostní dřeň, pupečnicková krev nebo periferní krev. V případě alogenních transplantací může být dárce příbuzný HLA identický dárce, rodinný haploidentický dárce, nebo nepříbuzný HLA identický dárce (MUD- matched-unrelated donor) (Seggewiss & Einsele 2010).

V České republice se v posledních letech provádí kolem 220 alogenních a 320 autologních transplantací kostní dřeně za rok (zdroj Česká transplantační společnost).

1.3.1. Komplikace po HSCT

Klinický obraz imunodeficiencie spojený s HSCT záleží na druhu choroby, pro kterou je indikována, na druhu předtransplantační přípravy, na věku příjemce, na typu dárce i na

zdroji a zpracování štěpu. Obecně lze říci, že pacienti podstupující transplantaci kostní dřeně jsou náchylní k nejrůznějším typům infekcí jak patogenními, tak zejména oportunními mikroorganismy (Mir & Battiwalla 2009).

V souvislosti s hlubokým posttransplantačním imunodeficitem se lze setkat i s velmi neobvyklým spektrem infekcí, vyvolaných bakteriemi, viry, plísněmi, prvoky i parazity. V období neutropenie jsou pacienti ohroženi septickými komplikacemi vyvolanými pseudomonádami, stafylokoky aj. patogeny spojenými s neutrofilovou dysfunkcí. V období buněčného imunodeficitu jsou na prvním místě cytomegalovirové a jiné herpetické (varicela-herpes-zoster, EBV) a adenovirové infekce (Hakki et al. 2003). Při delší době trvání buněčné imunodeficience přistupují infekce plísňové (aspergilózy, kandidózy aj.), bakteriální (leginelózy, mykobakteriόzy aj.) a popřípadě i parazitární choroby. Nezřídka má jeden pacient více infekcí současně, nebo následně (Mikulska et al. 2011).

Při buněčném imunodeficitu se může infekce projevat plíživě bez výrazných klinických příznaků, ale náhle vyústí do multiorgánového selhání. Proto je důležité pravidelně monitorovat nejenom klinické, ale i laboratorní znaky infekce. K průkazu infekčních agens je potřeba provádět přímou mikrobiologickou diagnostiku, nikoliv sérologii, protože je porušena adekvátní imunologická reaktivita organismu na infekci.

1.3.2. Role CMV po HSCT

CMV reaktivace mohou způsobovat orgánové postižení, které postihuje plíce, játra, střevo, nebo centrální nervový systém, a proto jsou jednou z vážných komplikací po HSCT. CMV seropozitivita je jedním z hlavních rizikových faktorů při posuzování mortality po transplantaci. Seropozitivní příjemci, kteří přijímají štěp od seropozitivního dárce, mají menší mortalitu po HSCT, na rozdíl od seropozitivních pacientů, kteří přijímají štěp od seronegativního dárce. Zvýšená mortalita u takovýchto pacientů souvisí s nedostatkem dárcovských CMV specifických lymfocytů ve štěpu. Tento nedostatek je pak po první CMV reaktivaci spojen s dalšími následnými reaktivacemi a větším rizikem propuknutí CMV nemoci (Ljungman 2008).

Při částečné neshodě mezi dárce a příjemcem (např. haploidentický štěp) lze použít štěpy, které neobsahují T-buňky (T-cell depleted, TCD), aby se snížilo riziko vzniku

GvHD (Gratama et al. 2001), ovšem za cenu vyššího výskytu mykotických a virových infekcí. Později bylo prokázáno, že i TCD HSCT může být stejně účinná jako běžná HSCT, pokud je z posttransplantační léčby vynechán antithymocitární globulin. Taková úprava protokolu pak vede k trvalému připojení štěpu s nízkým výskytem GvHD (Jakubowski et al. 2007). TCD štěpy obohacené o progenitorové buňky mohou dokonce zvýšit rychlost obnovy různých subpopulací imunitního systému, aniž by docházelo ke GvHD (Zakrzewski et al. 2007). Navíc se zdá, že u TCD alogenní HSCT hrají NK-buňky hlavní roli při kontrole virové reaktivace (Chen et al. 2006).

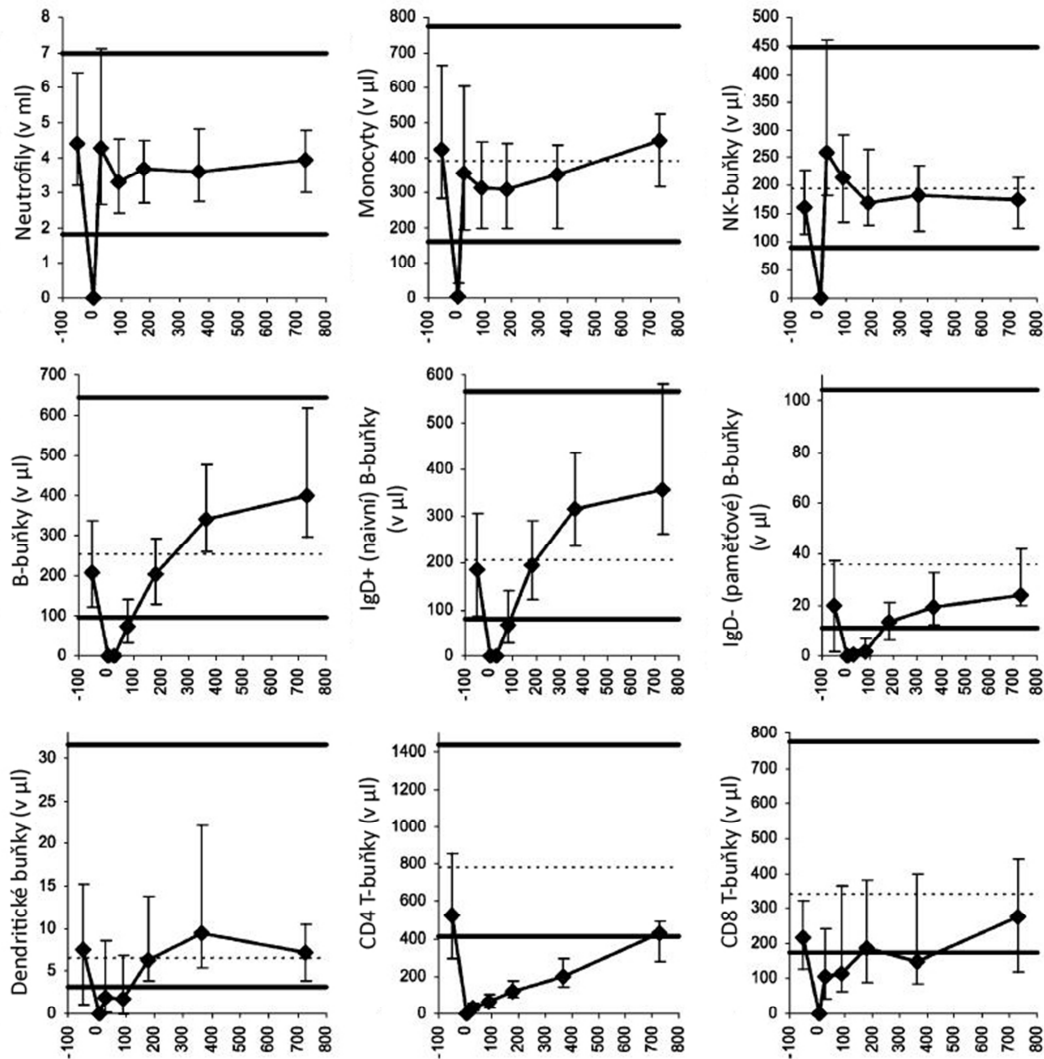
1.4. Rekonstituce imunitních funkcí po HSCT

Po transplantaci se podmínky pro aktivaci lymfocytů v těle pacienta značně liší od podmínek v těle zdravého člověka. Klíčovými parametry, které určují množství klonů s konkrétní specifitou, jsou právě podmínky a prostředí, ve kterých dochází k interakci mezi antigenem, antigenem-indukovanými cytokiny a antigen-specifickými lymfocyty (Storek 2008). Během prvních týdnů po transplantaci se díky vysoké přítomnosti prozánětlivých cytokinů, které jsou indukovány navykáním si na nové podmínky, v kombinaci s dostupným prostorem, který podporuje expanzi do homeopatické řady T-buněk, dramaticky mění složení přeneseného fondu lymfocytů. Velikost klonálně omezeného množství T-lymfocytů se může značně rozrůst, takže většina z T-buněčného fondu má pouze několik antigenních specifit (Roux et al. 1996).

Většina buněk ztrácí svoje naváděcí receptory pro vstup do sekundárních lymfoidních orgánů, aby zde mohlo docházet k interakci s antigen prezentujícími buňkami (APC) a ty pak mohly stimulovat B-lymfocyty. B-buňky se téměř úplně vytrácejí z cirkulace a znovu se objevují až po 2-3 měsících (Storek et al. 2001a). Ačkoliv se dokonce i repertoár B-buněk obnovuje relativně rychle, jejich protilátková odpověď bude omezena nedostatkem pomoci od T-buněk, a buď bude chybět úplně, nebo přinejlepším bude podobná primární B-buněčné odpovědi (Suzuki et al. 1996).

Transplantace hematopoetických kmenových buněk je spojena s vážným deficitem imunity. V důsledku toho je pacient vystaven velkému riziku různých infekcí. Vrozená imunita, která zahrnuje epiteliální bariéry, monocyty, granulocyty a NK-buňky, se obnovuje během několika týdnů po transplantaci. Na rozdíl od vrozené imunity se imunita

adaptivní obnovuje mnohem pomaleji. Množství B- a T-buněk se normalizuje až během prvních měsíců po transplantaci, ale obzvláště T-buněčná imunita může zůstat početně deficientní i 2 roky (Storek 2008) (Obr. 2).



Obr. 2: Obnova leukocytárních podskupin. Všechny osy x ukazují dny po transplantaci. Jsou ukázány mediány pacientů (diamanty) a 25-75 percentil (chybové příčky). Normální hodnoty mediány zobrazují přerušované příčky (u neutrofilů chybí). Silná linie ukazují normální 5-95 percentil. Předtransplantační vyšetření jsou obecně ukázána jako den -100. Převzato od Storek et al. (2004).

1.4.1. T buňky

Během prvních let, kdy byly klinicky prováděny transplantace kmenových buněk, nebylo jasné, proč množství T-lymfocytů dobře nekoreluje s výskytem infekcí. Teprve až po

zavedení specifických-monoklonálních protilátek proti jednotlivým podskupinám lymfocytů, se ukázalo, že během prvního roku po transplantaci je T-buněčný oddíl odlišný. Obsahuje totiž mnoho aktivovaných (HLA-DR⁺) buněk, nezanedbatelně více CD8⁺ buněk a mnohem méně naivních T-lymfocytů, než kolik jich mají zdraví lidé (Leino et al. 1991). Kromě toho, T-lymfocyty u pacientů po transplantaci mají sníženou odpověď na *in vitro* stimulaci mitogeny (Roux et al. 2000).

Ačkoliv takovéto dlouhodobé změny u T-lymfocytů mohly objasnit proč je pacientova T-buněčná imunita deficitní a proč je vakcinace nefunkční během prvního roku po transplantaci, konkrétní mechanismy, které tyto deficity způsobovaly, zůstávaly neznámé. Mackall & Gress (1997) ukázali, že lidské T-buňky jsou znovu obnovovány po intenzivní chemoterapii dvěma rozdílnými způsoby. První způsob je podobný ontogenezi, kdy buňky, které prošly thymem, znovu naplňují T-buněčný oddíl, a proto záleží na funkčnosti thymu. Druhý způsob, jak může být T-buněčný oddíl znovu osídlen, je buňkami, které vznikly expanzí periferních zralých T-lymfocytů. Tento způsob převládá, pokud je nízká aktivita thymu (Mackall et al. 1993), což je nejčastěji u dospělých pacientů. Několik publikací (Mackall et al. 1997, Dumont-Girard et al. 1998) ukázalo, že pacienti po HSCT s T-buněčně ochuzeným allogenním štěpem, kteří prošli celkovým ozářením a byl jim podáván cyklofosfamid (cytostatikum), mají právě T-buňky se zmiňovaným fenotypem. Infuze pouze malého množství dárcovských buněk pacientům má dva následky. Prvním je, že díky malé alloreaktivitě mohou dárcovské T-buňky přežít, protože příprava na transplantaci zničila pacientovu původní krevetvorbu (Roux et al. 1993), a tudíž každá nová T-buňka po transplantaci musí pocházet z mála T-buněk, které byly přítomny ve štěpu. Zvýšení počtu T-lymfocytů pak tedy musí být výsledkem buněčné expanze. Druhým následkem je, že počet dárcovských T-lymfocytů ve štěpu je tak malý, že během prvních dvou týdnů po transplantaci zůstává T-buněčný oddíl téměř prázdný. Dříve než se objeví první naivní T-buňky vzniklé z dárcovských, které už prošly vývojem v thymu, dochází k rychlé paralelní expanzi dárcovských ale i recipientních T-buněk, které znovu osidlují T-buněčný oddíl (Dumont-Girard et al. 1998). U dospělých se naivní T-buňky neobjevují dříve než po 4 měsících, obnova naivního T-buněčného rezervoáru může trvat od jednoho do dvou let a to pouze u pacientů mladších 45-50 let (Mackall et al. 1995, Hakim et al. 2005).

K repopulaci T-buněčného oddílu po transplantaci pomocí expanze dochází díky přirozeným homeostatickým mechanismům, které kontrolují velikost T-buněčného rezervoáru. U zdravých lidí T-lymfocyty soutěží o přístupné místo ve dření díky vychytávání homeostatických cytokinů jako je IL-7 a IL-15, které jsou produkovány buňkami nepocházejícími z krevní řady. Aktivací T-buněčného receptoru antigenem se zvyšuje schopnost T-buněk soutěžit o místo, takže nově vzniklé paměťové buňky mohou vstoupit do T-buněčného rezervoáru, aniž by zvětšily jeho velikost, protože nahrazují ty méně soutěživé (Jameson 2002). IL-7 a IL-15 je po transplantaci k dispozici malému množství T-buněk, které jsou přítomny, takže ochotně expandují, dokud nedosáhnou takového počtu, který je běžný u zdravých lidí. K homeostatické expanzi také dochází, když jsou T-buňky aktivovány vlastními peptidy (Goldrath & Bewan 1999), a proto není striktně závislá na antigenech. Přítomnost antigenů vede ke zvýhodnění proliferace právě těch buněk, které je rozpoznávají. Následkem toho je T-buněčný oddíl naplněn hlavně buňkami, které rozpoznávají antigeny, jež jsou přítomny v dárci v době transplantace (Mackall et al. 1996). Díky tomu mohou být mnohé části T-buněčného repertoáru namířené proti nesouhlasícím histokompatibilním antigenům (Mutis et al. 1999), nebo proti herpetickým virům (Gratama et al. 2001), které jsou přítomny ve většině pacientů v době transplantace, zatímco ostatní specifity T-buněk mohou být kompletně ztraceny (Mackall et al. 1996).

Znovu osidlování T-buněčného oddílu homeostatickou expanzí ovšem neobnovuje T-buněčnou imunitu v plném rozsahu. Ačkoliv se frekvence infekcí výrazně snižuje poté, co se obnoví vrozená imunita, pacienti zůstávají ve skupině vysokého rizika během prvních dvou let po transplantaci a mají výrazně vyšší morbiditu na infekční onemocnění, než jejich vrstevníci. Později po transplantaci a při absenci GvHD jsou infekce méně časté a převládajícími patogeny jsou viry. Odpověď na vakcinace během prvního roku po transplantaci je navíc nízká nebo chybí úplně (Storek et al. 1997).

Posttransplantační deficit T-buněčné imunity je způsoben zničením pacientových T-buněk, nedostatkem efektivního přenosu dárcovské imunity a neschopností thymu produkovat dostatečná množství naivních T-lymfocytů. Zajímavé je, že časně po transplantaci se dají lehce nalézt CMV- nebo EBV- specifické T-lymfocyty v obvykle větších frekvencích než u zdravých jedinců (Lucas et al. 1996, Chalandon et al. 2006). Klíčovým faktorem je přítomnost antigenu, který spouští velkou expanzi T-buněk v prostředí chudém na

lymfocyty (Mackall et al. 1996). Důsledkem tohoto efektu je přenesení imunity proti těmto antigenům, zatímco ostatní specifity jsou ztraceny. To může být způsobeno tím, že dochází k homeostatickému soutěžení T-buněk aktivovaných antigenem, nebo tím, že přenesené T-lymfocyty po transplantaci ztrácí naváděcí receptory nutné pro cirkulaci lymfatickými uzlinami, tudíž se nesetkávají s antigen prezentujícími dendritickými buňkami.

Jakmile dojde ke znovu osídlení T-buněčného oddílu klonální expanzí a dojde ke ztrátě mnoha antigenních specifit, může dojít ke kompletní obnově T-buněčného repertoáru pouze pomocí naivních T-lymfocytů, které prošly vývojem v thymu (Gandhi et al. 2003).

1.4.2. B buňky

B-buňky jsou během prvních dvou měsíců po transplantaci přítomny jen v malém počtu nebo vůbec nejsou detekovatelné (Storek et al. 1993). Později se jejich počet zvyšuje a během prvního a druhého roku po přijetí štěpu je jejich počet v krvi dokonce nad normálem. Nárůst počtu B-lymfocytů je větší u pacientů bez GvHD než u těch, kteří trpí GvHD (Kook et al. 1996), nejspíše proto, že GvHD a jeho léčba brání ve vývoji B-lymfocytů (Storek et al. 2001a).

Během prvního až druhého roku po transplantaci jsou paměťové B-buňky vzácné, většina vyskytujících se B-lymfocytů je naivních (Storek et al. 1993), postrádají somaticky mutované VDJ geny (Suzuki et al. 1996) a produkují spíše IgM protilátky než IgG nebo IgA (Storek et al. 1995). Zajímavé je, že celková hladina imunoglobulinů neodpovídá posttransplantační humorální imunitě, jelikož mnoho protilátek může být produkováno jako autoprottilátky nebo jako mono/oligoklonální protilátky irelevantní specifity, spíše než jako protilátky specifické proti infekčním agens (Gerritsen et al. 1993). Množství specifických protilátek závisí na setkávání s antigeny po transplantaci. Bez setkání se s antigenem zůstávají hladiny specifických protilátek nedetekovatelné často i po několik let (Ljungman et al. 1994). V případě proteinových antigenů, pokud dojde k setkání se s antigenem (např. u CMV seropozitivních pacientů), dochází k obnově specifických protilátek na normální úroveň během jednoho roku (Engelhard et al. 1991). V případě polysacharidových antigenů ovšem dochází k obnově specifických protilátek velice pozdě a to mezi druhým až dvacátým rokem po transplantaci, dokonce i tehdy pokud dojde ke kontaktu s antigenem (Storek et al. 2001b).

1.4.3. Fagocyty a antigen prezentující buňky (APC)

Počty neutrofilů se běžně dostávají na normální hladinu během prvních 3 týdnů (Cornelissen 2004). Jejich funkčnost jako chemotaxe, fagocytóza, produkce superoxidových radikálů a zabíjení bakterií, je časně po transplantaci subnormální. U pacientů, kteří trpí chronickou GvHD je funkčnost neutrofilů trvale na subnormální úrovni, což je nejspíš následkem podávání kortikosteroidů (Cornelissen 2004).

Množství monocytů se dostává na normální hladinu do jednoho měsíce po transplantaci (Rommeley et al. 2011). Makrofágy jsou relativně chemo/radiorezistentní, takže jejich počty podstatně neklesají, ale po transplantaci jsou postupně během několika měsíců nahrazovány dárcovskými (Nakata et al. 1999). Funkce monocytů se dostává na normální hladinu zhruba po roce, i když některé práce ukazují, že k plné obnově schopnosti fagocytózy dochází už krátce po transplantaci, ale schopnost buněk odpovídat oxidativním vzplanutím se postupně obnovuje kolem druhého měsíce po transplantaci (Rommeley et al. 2011, Scholl et al. 2007).

Dendritické buňky se dají rozdělit přinejmenším na 5 kategorií podle jejich lokalizace: (1) epiteliální dendritické buňky (2) dendritické buňky v lymfatických uzlinách a slezině, (3) krevní dendritické buňky, (4) dendritické buňky v tymu a na (5) dendritické buňky v germinálních centrech lymfatických uzlin a slezině. Každá kategorie dendritických buněk se obnovuje v jiných časových bodech, obecně se ale dá říci, že se obnovují od prvního měsíce až po jeden rok od transplantace (Storek et al. 2008).

1.4.4. NK-buňky

Počty NK-buněk stejně jako jejich cytotoxicita, se obnovují během prvních týdnů po transplantaci (Chklovskaja et al. 2004). Dokonce dochází ke zvýšení jejich počtu během prvních tří měsíců po transplantaci, což odpovídá jejich roli v obraně proti herpetickým virům (Kuijpers et al. 2008). Fenotypově jsou NK-buňky, které znovu osidlují pacienta, odlišné od NK-buněk u zdravých lidí. Hlavní rozdíl je především v přítomnosti CD56^{high} CD16⁻ populace, která produkuje více INF- γ a zároveň jsou tyto buňky méně cytotoxické (Dulphy et al. 2008).

Nedávné výzkumy ukázaly, že NK-buňky, které během prvních měsíců znovu osidlují pacienty, zabíjí cílové buňky, které na svém povrchu nemají ligandy pro inhibici KIR (Ruggeri et al. 1999). Díky tomuto efektu mají NK-buňky signifikantní antileukemický efekt u pacientů s AML (Ruggeri et al. 2007).

1.5. Možnosti testování imunitních funkcí člověka

Pro analýzu imunitních buněk je nejvhodnější metodou průtoková cytometrie. Ačkoliv povrchové znaky na některých buňkách odpovídají jejich funkcím, nemusí být vždy možné na základě povrchových znaků určit funkci buňky, jelikož fenotypově stejné buňky mohou plnit různé funkce *in vivo*, díky expresi jiných proteinů intracelulárně. Tento fakt byl potvrzen charakterizací Th1 a Th2 subpopulací CD4⁺ T-buněk v závislosti na expresi různého profilu cytokinů těchto dvou populací. Identifikace funkčních podskupin CD4⁺ T-lymfocytů polarizovanou produkcí cytokinů byla původně založena na charakterizaci T-buněčných klonů pomocí cytokinové ELISA (Mosman et al. 1986). Tato metoda ovšem začíná být nepraktická, pokud má být testováno větší množství heterogenních buněk, které byly získány *ex vivo*. Vytvoření dostatečného množství klonů je náročné a pouze menšina efektorových buněk má klonogenní potenciál (Lalvani et al. 1997).

Bylo vytvořeno několik metod, které umožňují měřit cytokinovou expresi: ELISA, ELISPOT, RT-PCR, LDA (limitní ředění), ISH (*in situ* hybridizace), imunohistochemie a intracelulární značení cytokinů (ICS). Výhody a nevýhody těchto metod uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1: Srovnání metod, využívaných k detekci cytokinů (převzato od Pala et al. (2000))

	Intracelulární barvení cytokinů	ELISPOT	ELISA	RT-PCR	Limitní ředění	<i>In situ</i> hybridizace	Imuno- histochemie	Imuno- cytochemie
Analyt	Protein	Protein	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	Protein
Hodnota	Frekvence	Frekvence	Integrované množství	Integrované množství	Frekvence	Lokalizace	Lokalizace	Lokalizace
Nástroj	Průtokový cytometr	Mikroskop	Spektro- fotometr	Teplotní cyclers	Spektro- fotometr	Světelný/ elektronový mikroskop	Světelný/ elektronový mikroskop	Konfokální mikroskop
Zachycení více cytokinů	Ano	Obtížně	Ne	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano
Určení fenotypu na povrchu buňky	Možné	Před- výběrem	Před- výběrem	Před- výběrem	Možné	Možné	Možné	Možné

LDA, ELISPOT a ICS jsou nejvhodnější metody pro stanovení frekvence buněk produkujících cytokiny. ELISA měří celkové množství sekretovaného proteinu, RT-PCR měří hladinu mRNA specifického genu semikvantitativně, zatímco ISH a imunohistochemie je užitečná při lokalizaci buněk, které produkují cytokiny v tkáních.

Metoda intracelulárního barvení cytokinů, byla poprvé vyzkoušena Anderssonem ve Stockholmu v osmdesátých letech (Sander et al. 1991). Poté co byly vyvinuty metody na fixaci a permeabilizaci lymfocytů, byl dalším krokem vývoj sekrečních inhibitorů, aby se zabránilo sekreci cytokinů a umožnila se jejich akumulace uvnitř buněk (Schmitz et al. 1993, Jung et al. 1993). Nakonec byla tato metoda vylepšena díky měření velkých panelů, které obsahovaly monoklonální protilátky, což umožnilo vybrat takové protilátky, které se váží na cytokiny v jejich fixované formě nejlépe a tím byl umožněn vývoj různých praktických metod (Openshaw et al. 1995).

Provádění analýzy buněk značených metodou ICS pomocí průtokového cytometru umožňuje individuální charakteristiku velkého množství buněk a tak ukazuje celou heterogenitu jednotlivých buněčných populací. Ve srovnání s ELISA má metoda ICS velkou výhodu, protože více barevné značení nám umožňuje zjistit exkluzivní nebo společnou expresi rozdílných cytokinů na jedné buňce. Takováto informace nám dále umožňuje charakterizaci dalších T-buněčných podskupin na základě nejen povrchových znaků, ale i produkce cytokinů.

Mezi další imunologické metody na testování imunologických funkcí patří například stanovení protilátek v séru, kdy se nejčastěji používá ELISA, ale pro přesnější stanovení je vhodné použít průtokovou cytometrii, která detekuje i více specifických protilátek na jednou. K měření míry proliferace v reakci na mitogeny se používá metoda radioaktivního měření proliferačních sond, nebo také metoda měření inkorporace fluorescenčních práb pomocí průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie se také používá u několika testů oxidativního vzplanutí makrofágů, kdy se původně nefluorescenční sloučenina dostává do makrofágů, kde se působením oxidativních radikálů mění na fluorescenční sondu (Tarpey et al. 2004).

1.5.1. Detekce specifických T-lymfocytů u pacientů po HSCT

Po transplantaci kmenových buněk krvetvorby (HSCT) jsou pacienti ohroženi infekčními komplikacemi latentními viry, protože vlivem transplantačních režimů u nich dochází k sekundárnímu imunodeficitu, což vede k opakovaným, často život ohrožujícím reaktivacím CMV s nutností léčby virostatiky.

CMV infekce u imunokompromitovaných pacientů, kteří nemají virostatickou terapii, může probíhat fulminantně. Dochází k rozvoji virémie s horečkou, leukopenií a poškozením orgánů, zejména jater a trávicího systému. Nečastěji se jedná o reaktivaci latentního CMV, méně často pak jde o primoinfekci. Normální funkce imunitního systému, zvláště pak T-lymfocytů, se vlivem použitých transplantačních režimů obnovuje za jeden až dva roky po HSCT (Storek et al. 2008). CMV proto zůstává příčinou signifikantní morbiditativy a mortality i přes výrazné pokroky v léčbě (Boeckh & Ljungman 2009, Baldanti et al. 2008).

Dlouhodobá protekce je zprostředkována rekonstitucí CMV specifické imunity, zejména T-lymfocyty (Hakki et al. 2003). I přesto, že bylo provedeno mnoho studií u imunokompromitovaných pacientů, zůstávají naše znalosti protektivních faktorů velmi omezené. Ukazuje se také, že dostatečnou imunitní odpověď nelze predikovat pouze na základě počtu CMV specifických lymfocytů (Morita-Hoshi et al. 2008), nebo na základě množství lymfocytů produkujících interferon- γ (INF- γ) (Barron et al. 2009).

Protože je v dnešní době standardem monitorování virových náloží pomocí detekce virové DNA v krvi za použití PCR a neexistuje jasný korelát protekce při studiu lymfocytů pomocí detekce produkce IFN- γ , rozhodli jsme se sestavit cytometrický test s použitím osmibarevného panelu protilátek, který umožňuje simultánní detekci základních funkcí CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů z jednoho vzorku krve metodou mnohobarevné průtokové cytometrie a ICS.

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle této diplomové práce byly:

1. Porovnání CMV specifické odpovědi u T-lymfocytů mezi pacienty kontrolujícími a nekontrolujícími CMV reaktivace po HSCT.
2. Porovnání změny funkčních odpovědí CMV specifických T-lymfocytů u pacientů po HSCT v různých časových bodech.
3. Vytvoření nového degranulačního testu NK-buněk.
4. Vytvoření testu pro stanovení míry cytotoxické schopnosti NK-buněk.

3. METODIKA

Veškeré laboratorní práce uváděné v této diplomové práci byly prováděny v laboratořích CLIP – cytometrie, laboratorního centra Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty UK.

3.1. Zpracování buněk

Uvedené postupy této podkapitoly, kromě centrifugování a zahřívání ve vodní lázni, je potřeba provádět ve sterilním mikrobiologickém boxu, aby nedošlo ke kontaminaci buněk mikroorganismy z prostředí.

Rozmrazování buněk

Buňky rozmrazíme ve vodní lázni (37°C), smísíme s 10ml média, centrifugujeme (243g, 5min, 25°C, centrifuga Universal 320R, rotor 1619, Hettich, SRN), supernatant odstraníme, sediment resuspendujeme v 7ml média a přemístíme do kultivačních lahví o objemu 25ml (TPP).

Příprava média pro buněčné kultury

Kultivační médium mícháme v následujícím poměru: 500ml RPMI-1640 s L-Glutaminem a 25mM HEPES + 5ml směsi penicilinu (konečná koncentrace 100 µg/ml) a streptomycinu (konečná koncentrace 100µg/ml) + 50ml inaktivovaného fetálního hovězího séra (FBS).

Inaktivace fetálního hovězího séra (FBS)

Zásobní FBS nejprve rozpustíme ve vodní lázni (37°C), inaktivujeme při 56°C po dobu 30 min, rozdělíme po 50ml a skladujeme v mrazáku při teplotě -20°C.

Kultivace buněk

Buňky kultivujeme v 7ml média v kultivačních lahvích (TPP, Švýcarsko) v inkubátoru při 37°C a 5% CO₂.

Pasážování buněk

Během kultivace je potřeba dodat čerstvé médium a odstranit použité médium s mrtvými buňkami. Tomuto procesu se říká pasážování a mělo by být prováděno přibližně dvakrát týdně. Buňky centrifugujeme (243g, 5min, 25°C), vzniklý sediment resuspendujeme v 7ml média a buňky umístíme zpět do inkubátoru (37°C, 5% CO₂).

Skladování buněk

Peletu, tvořenou přibližně 10 miliony buněk, resuspendujeme v 1ml čerstvě připraveného 10% dimethylsulfoxidu (DMSO) v inaktivovaném FBS mediu. Vzhledem k toxicitě DMSO přemístíme zamrazovací zkumavky ihned na led. Poté je vložíme v nádobě Mr. Frosty (Wessington Cryogenics, Velká Británie) do teploty -80°C a po 24h zkumavky přemístíme do boxů s tekutým dusíkem pro dlouhodobé skladování při teplotě -196° C.

3.2. Izolace lymfocytů z periferní krve (PK), nebo krevního preparátu („buffy coat“, BC) pomocí centrifugace s využitím hustotního gradientu Ficoll-Hypaque

V laboratoři CLIP jsou lymfocyty z PK, nebo BC izolovány dvěma způsoby. Při prvním způsobu jsou ze vzorku izolovány všechny druhy lymfocytů a monocyty. Druhý způsob využívá sady RossetteSep a lze tak izolovat pouze NK-buňky. Ficoll-Hypaque je cukerný roztok, který odděluje jednotlivé složky krve na základě jejich hustoty v sestupném pořadí v centrifugační zkumavce: (i) plasma, (ii) prstenec lymfocytů a monocytů, (iii) roztok Ficollu a (iv) sediment ostatních buněk krve.

Izolace lymfocytů a monocytů

Vzorek PK je třeba naředit 1:1 s PBS (fosfátový pufr, pH 7,4), BC ředíme 1:2 s PBS. Naředěný vzorek navrstvíme na 10ml roztoku Ficoll a centrifugujeme (400g, 30min, 25°C, nulová brzdící rychlost). Prstenec lymfocytů odebíráme opatrně pomocí Pasteurovy pipety do 10ml PBS a znovu centrifugujeme (1 000g, 10min, 25°C). Po odstranění supernatantu sediment resuspendujeme v 10ml kultivačního média a necháváme přes noc v inkubátoru (37°C, 5% CO₂).

Izolace NK-buněk pomocí RossetteSep sady

Roztok RossetteSep obsahuje protilátky proti CD3, CD4, CD19, CD36, CD66b, CD123, jež váží buňky krve, které je potřeba při izolaci NK-buněk odstranit. Nežádoucí buňky jsou těmito protilátkami zesíťovány pomocí tetramerního protilátkového komplexu (TAC) a při centrifugaci sedimentují na dno zkumavky.

Do 1ml neředěného vzorku nejprve přidáme 50 μ l příslušného roztoku RossetteSep, vzorek řádně promícháme a inkubujeme 20min při 25°C na výkyvné plošině. Poté vzorek naředíme 1:1 (v případě BC 1:2) s PBS a nanese na 10ml roztoku Ficoll. Další postup je identický s postupem uvedeným u izolace lymfocytů a monocytů.

3.3. Průtoková cytometrie a cytometrická analýza

Průtoková cytometrie je hojně využívaná laboratorní metoda, která umožňuje měření mnoha parametrů zároveň na velkém množství částic (Eckschlager et al. 1999). V hematologickém a biologickém výzkumu se průtoková cytometrie používá již od začátku 70-tých let, kdy Fulwyler sestrojil první průtokový cytometr-sorter, který rozlišoval buňky na základě buněčného objemu (Fulwyler et al. 1969). Jejím výhodou je velké množství sledovaných parametrů, jako je odražené světlo v pravém úhlu, fluorescence atd. Další výhodou je rychlost analýzy – v 90. letech se jednalo o 10 000 a více buněk za minutu (Eckschlager et al. 1999), v současnosti je možné dosáhnout až 50 000 buněk za sekundu

Nejčastěji využívanými parametry jsou rozptyl světla v přímém úhlu, tzv. Forward Scatter (FSC), který je přímo úměrný velikosti buněk, rozptyl světla v úhlu 90°, tzv. Side Scatter (SSC), který je ovlivněn komplexitou membrán uvnitř částic a dále fluorescence různých vlnových délek. Měřené částice (suspenze buněk označených protilátkami konjugovanými s fluorescenční značkou, tzv. fluorochromem, nebo fluorescenčními próbami) jsou unášeny laminárním proudem nosné kapaliny velmi tenkou tryskou do silnější kapiláry, kterou proudí nosná tekutina. To usměrní částice do tenkého proudu. Jedna za druhou postupují průtokovou komůrkou, v níž protínají laserový paprsek. Laserový paprsek excituje na buňkách navázané konjugáty protilátka-fluorochrom nebo samotné fluorescenční próby, které emitují světelné signály o vlnové délce určené typem fluorochromu, které jsou

převedené na elektrické impulsy fotonásobičem (Eckschlager et al. 1999). Průtokový cytometr BD LSRII nám umožňuje zapojením 4 laserů excitovat až 16 různých fluorescenčních značek zároveň.

3.4. Optimalizace cytometrického experimentu

V rámci přípravy jednotlivých experimentů je třeba mít na zřeteli následující faktory: 1. výběr vhodných fluorochromů pro jednotlivé znaky, 2. zvolení vhodné koncentrace monoklonálních protilátek a případně 3. výběr lepšího fluorochromu pro daný znak.

Výběr vhodného fluorochromu pro jednotlivé znaky

V rámci optimalizace osmibarevného panelu na zjištění funkčnosti jednotlivých T-buněčných podskupin bylo potřeba vybrat takovou kombinaci fluorochromů, aby poskytovaly dostatečnou informaci o přítomnosti slabě exprimovaných znaků, a aby zároveň jejich přesvit do kanálů jiných fluorochromů nebyl příliš vysoký. Při použití tří laserů je potřeba obzvláště pečlivě vybrat takové fluorochromy, aby jejich spektrální interakce byly co nejmenší. Na základě práce Bigose et al. (1999) jsme použili pro znaky našeho zájmu nejjasnější fluorochromy jako jsou PE, APC, PE-Cy7, abychom co nejlépe odlišili barvené populace od neznačeného pozadí, a pro rozlišovací znaky jednotlivých populací jsme použili fluorochromy s menší intenzitou jako jsou ECD, PerCP-5,5 aj. Rozlišovací schopnost méně jasných barev je ovšem kompenzována větším počtem povrchových epitopů, na které se monoklonální protilátka s navázaným fluorochromem může přichytit, což nám umožňuje dobré rozlišení mezi značenými populacemi a neznačeným pozadím.

Abychom odstranili spektrální překryvy mezi fluorochromy, které jsou excitovány stejnými lasery, je potřeba vytvořit ke každému experimentu, u kterého tyto překryvy hrozí, kompenzační kontroly. Pomocí těchto kontrol je poté automaticky z každého kanálu odečtena jistá část intenzity fluorescence, která je způsobena právě tímto přesvitem (Bigos et al. 1999). Takovýto výběr fluorochromů nám poté umožňuje bezpečnou a přesnou analýzu dat, aniž by obsahovala falešně pozitivní a falešně negativních události.

Zvolení vhodné koncentrace monoklonálních protilátek (titrace)

Jelikož každý klon monoklonálních protilátek se váže ke svému epitopu s jinou afinitou, je dobré si tuto protilátku před prvním použitím nejprve vytitrovat. Titrací pak nejenom můžeme snížit nespecifické pozadí, ale zároveň i ušetříme náklady, jelikož nám protilátky vydrží na více testů, než udává výrobce. Protilátky a další fluorochromy, používané v experimentech, uvádí Tabulka 2.

Testování vhodné koncentrace je nutné provádět za stejných podmínek, za jakých následně budeme provádět experimenty, abychom protilátky titrovali přesně podle potřeb daného experimentu. Pokud titrujeme novou protilátku, začínáme od koncentrace udané výrobcem a postupně ji vždy snižujeme o polovinu. Takto si vytvoříme pět až šest testovacích dávek protilátky, které následně přidáme k námi zkoumaným buňkám. Změřená data z jednotlivých testovacích dávek pak porovnáváme v softwaru FlowJo, kdy vynesemím všech naměřených dat do jednoho grafu vidíme, která koncentrace protilátek poskytne při co nejnižší koncentraci ještě maximální hodnotu fluorescence pozitivní populace buněk.

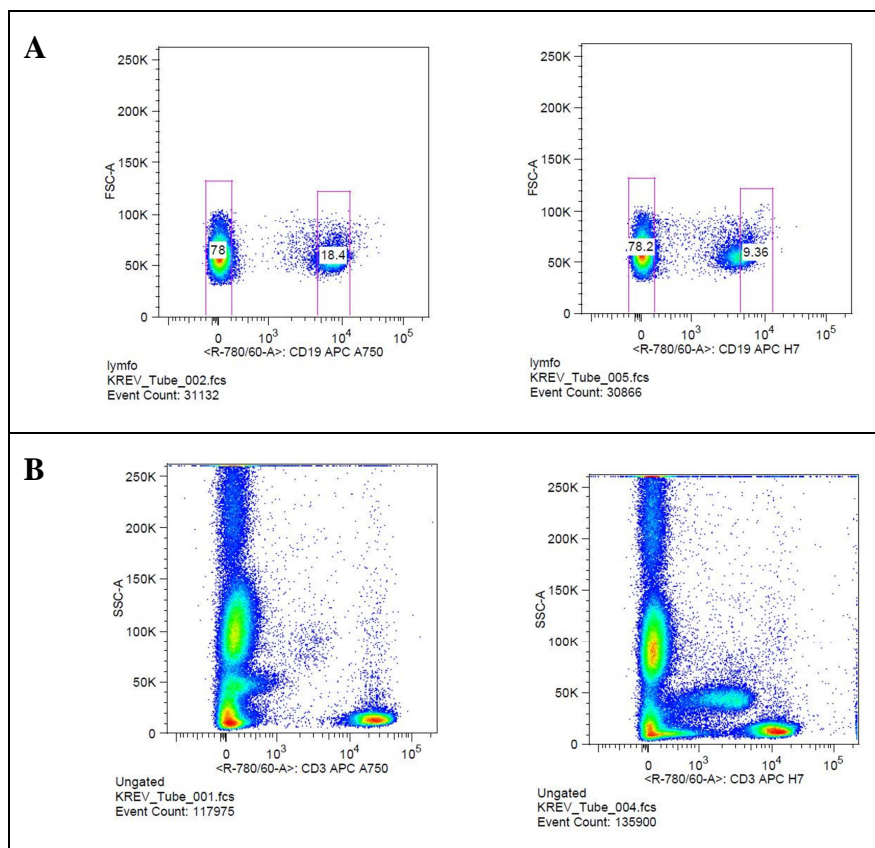
Tabulka 2: Seznam protilátek a dalších fluorochromů, používaných v prováděných experimentech

Protilátka	Klon	Výrobce	Protilátka	Klon	Výrobce
CD3 APC	UCHT1	Beckman Coulter	CD33 APC	D3HL60.25 1	Beckman Coulter
CD3 PerCP-Cy5.5	OKT3	eBioscience	CD56 APC	MEM-188	Exbio
CD3 PC7	UCHT1	Beckman Coulter	CD154 PE	MR1	Beckman Coulter
CD4 ECD	SFC112T4D11	Beckman Coulter	Annexin V FITC		Exbio
CD8 HV-500	RPA-T8	BD Bioscience	IL-2 APC	MQ1-17H12	eBioscience
CD14 PB	MEM-15	Exbio	INF- γ PE-Cy7	4S.B3	eBioscience
CD16 PE	B73.1	BD Bioscience	PI		Miltenyi Biotec
CD20 PB	2H7	Biologend			
LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit PB					Invitrogen

Výběr optimálního fluorochromu

Pokud máme dvě monoklonální protilátky, které váží stejný epitop, konjugované s různými fluorochromy, je dobré vyzkoušet, zda mezi těmito protilátkami není rozdíl ať už v intenzitě fluorochromu nebo v nespecifické vazbě jiných než požadovaných buněk.

Pro testování dvou stejných monoklonálních protilátek s navázaným jiným fluorochromem používáme buňky, které nás následně budou zajímat v dalších experimentech. Používáme stejnou koncentraci obou protilátek a změřená data pak analyzujeme v softwaru FlowJo. Porovnáním značených populací s jednotlivými protilátkami pak vidíme, která lépe značí námi hledanou populaci (Obr. 3 A) a zároveň, zdali některá z testovaných protilátek nemá lepší nespecifickou vazbu než jiná (Obr. 3 B). Na základě takto získaných informací pak můžeme vybrat nejvhodnější protilátku pro budoucí experiment.



Obr. 3: Ukázka variability mezi fluorochromy, (A) ukazuje větší intenzitu značení CD19 pomocí APC Alexa 750 oproti APC H7, (B) ukazuje menší nespecifickou vazbu protilátky CD3 s fluorochromem APC Alexa 750 proti APC H7.

3.5. Rekonstituce funkční imunity po transplantaci hematopoetických kmenových buněk

3.5.1. Pacienti

V letech 2008-2011 jsme provedli celkem 600 vyšetření CMV specifických T-lymfocytů u 89 pacientů. V období od podzimu 2008 do podzimu 2009 byla vyšetřena první kohorta pacientů (kohorta 1). Výsledky z této kohorty pacientů byly publikovány (Król et al. 2011). Od podzimu 2009 do podzimu 2010 byla prováděna vyšetření na druhé kohortě pacientů (kohorta 2), data z těchto vyšetření publikována dosud nebyla. V posledním období (od podzimu 2010 do konce roku 2011) byla prováděna vyšetření na třetí kohortě pacientů (kohorta 3). Vyšetření na kohortách pacientů 1 a 2 byla prováděna MUDr. Ladislavem Królem, na jehož práci jsem navázal vyšetřováním specifických T-lymfocytů u pacientů v kohortě 3. V této kohortě bylo provedeno 229 vyšetření u 45 pacientů.

Jak již bylo řečeno, krevní vzorky byly získány celkem od 89 pacientů, kteří podstoupili allogenní transplantaci krevních hematopoetických buněk. U pacientů jsme stanovili, zda jsou schopni CMV reaktivaci kontrolovat či nikoliv na základě několika událostí. Pokud jsme u pacienta během sledování nezjistili CMV reaktivaci, považujeme ho za pacienta bez reaktivity. Pokud u pacienta k CMV reaktivaci došlo a zároveň měl tento pacient po dobu dvou týdnů hodnotu virové nálože menší než 100 aniž by byl léčen antiviroviky a po dobu dalších tří měsíců u něj k reaktivaci nedošlo, považujeme ho za kontrolóra CMV reaktivity. Ostatní pacienti, kteří měli CMV reaktivaci, ale neplatí pro ně předchozí kritéria, byli považováni v době měření za nekontrolovanou CMV infekci.

Dále jsme pacienty rozdělili do čtyř skupin podle jejich minulosti CMV reaktivity:

1. Pacienti, kteří jsou CMV-seropozitivní, ovšem neměli během pozorování žádnou CMV reaktivaci (CMV-WR; „without reactivation“).
2. Pacienti, kteří jsou CMV-seropozitivní a zároveň kontrolují CMV reaktivaci (CMV-CR; „controlling reactivation“). Tito pacienti měli pomocí PCR dokumentovanou CMV reaktivaci, ovšem nedošlo u nich k žádnému klinickému projevu CMV nemoci.
3. Pacienti, kteří jsou CMV-seropozitivní a současně nekontrolují CMV reaktivaci (CMV-NC; „non-controlling“). U nich bylo pomocí PCR dokumentovaná CMV reaktivace a zároveň u nich došlo ke klinickému projevu CMV nemoci.

4. Pacienti, kteří byli před transplantací CMV-seronegovní, současně měli CMV-seronegovního dárce a zároveň u nich nedošlo k žádné CMV reaktivaci (CMV-NAH; „naive after HSCT“).

3.5.2. Monitorování CMV virové nálože

Sledování CMV virové nálože bylo prováděno pomocí kvantitativní real-time PCR (RQ-PCR) v laboratoři molekulární genetiky Pediatrické kliniky (MUDr. Hubáček). Virové nálože byly následně normalizovány na 10 000 lidských genomických ekvivalentů, které byly získány kvantifikací genu pro albumin (Tanaka et al. 2000). Normalizované virové nálože, jejichž hodnota byla větší než 100, byly považovány za klinicky signifikantní a u těchto pacientů byla zahájena preemptivní léčba ganciklovirem. Tato léčba byla přerušena po minimálně třech týdnech v momentě negativních výsledků CMV nálože z PCR, nebo při poklesu virové nálože pod signifikantní hranici. Pokud byla virová nálož nad signifikantní hranicí i po třech týdnech preemptivní léčby, byli pacienti léčeni navíc foscarnetem. Monitorování hladiny CMV pomocí RQ-PCR začalo vždy sedmý den po transplantaci kostní dřeně a bylo prováděno každý týden po tři měsíce od transplantace. Následně byla virová nálož stanovována každé dva týdny po dobu šesti měsíců od transplantace a po této době se měření CMV virové nálože provádělo jednou za měsíc. PCR vyšetření bylo prováděno navíc také každý týden, pokud pacient trpěl CMV reaktivací, nebo pokud podstupoval imunosupresivní terapii v případech GvHD.

Monitorování CMV specifických T-buněk začalo vždy ve dni 28+ po transplantaci a bylo prováděno každý týden během hospitalizace pacienta a následně ve dnech 56+, 90+, 180+ a 365+ po transplantaci. Pokud u pacientů došlo k reaktivaci CMV, byli monitorováni každý týden do doby, než virová nálož stanovená pomocí PCR nebyla negativní. Pacienti, kteří byli více než rok po transplantaci, byli vyšetřováni jednou za rok při výročí transplantace.

3.6. Stimulace antigeny

Ze získaných krevních vzorků pacientů po transplantaci hematopoetických krevních buněk vyzolujeme lymfocyty (viz výše) a následně necháme přes noc inkubovat v inkubátoru při

36°C a 5% CO₂. Po inkubaci jsou izolované lymfocyty připraveny na stimulaci a značení pomocí metody intracelulárního značení cytokinů (ICS) – viz níže. Vyizolované lymfocyty rozdělujeme po 100 µl a přenášíme do 96-v-jamkové destičky. V první jamce necháme lymfocyty samotné jako negativní kontrolu, do druhé jamky přidáme k lymfocytům směs CMV antigenů IE-1 a pp65 na konečnou koncentraci 1 µg/ml a CMV lyzát o koncentraci 10 µg/ml. Buňky v druhé jamce jsou pak specificky stimulované. Ve třetí jamce jsou lymfocyty stimulovány pomocí anti-CD3 protilátky (10 µg/ml, Exbio Praha) a používáme je jako nespécificky stimulovanou kontrolu. Do všech jamek ještě přidáme protilátku proti CD107a Alexa488 (1 µg/ml klon B-T47, Exbio Praha) a kostimulační protilátku CD28/49d (1 µg/ml BD Biosciences, San Jose).

Inhibice sekrece cytokinů

Po 2 hodinách přidáme do všech jamek brefeldin A (10 µg/ml, Sigma-Aldrich, Saint Louise, MO, USA), který slouží jako inhibitor transportu z Golgiho komplexu, a necháme inkubovat další 4 hodiny.

Peptidy a CMV lyzát

Ke stimulaci CD8⁺ lymfocytů jsme použili směs peptidů o 15 aminokyselinách (11 překrývajících se), odpovídajících hlavním CMV imunogenním proteinům pp65 a IE-1 (JPT Peptides, Berlin, Německo). Pro stimulaci CD4⁺ lymfocytů byl použit CMV lyzát (Vidia, Vestec u Prahy). Oba typy stimulace byly současně provedeny v jedné jamce.

3.7. Metoda ICS

K určení funkčnosti T-lymfocytů používáme osmibarevný panel protilátek, kdy nejprve značíme izolované lymfocyty povrchově, a po fixaci (BD FACS Lysing Solution) a permeabilizaci (BD FACS Permeabilizing Solution 2) jsou značeny intracelulárně.

Povrchové značení

Po šestihodinové inkubaci lymfocytů s antigeny jsou do každé jamky přidány monoklonální protilátky CD14 Pacific Blue, CD20 Pacific Blue (Exbio Praha), CD8 Horizon V-500 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a dále LIVE/DEAD Violet Viability Dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 2 ml 0,1mM EDTA (Sigma-Aldrich). Povrchové značení probíhá ve tmě po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Po povrchovém značení buňky doplníme každou jamku do 200 μ l promývacím pufrem (PBS obsahující 0,1% azid sodný a 2% želatínu (Sigma-Aldrich)) a centrifugujeme 500g 8 minut. Po centrifugaci slijeme supernatant a následuje lyzace a permeabilizace.

Lyzace a permeabilizace

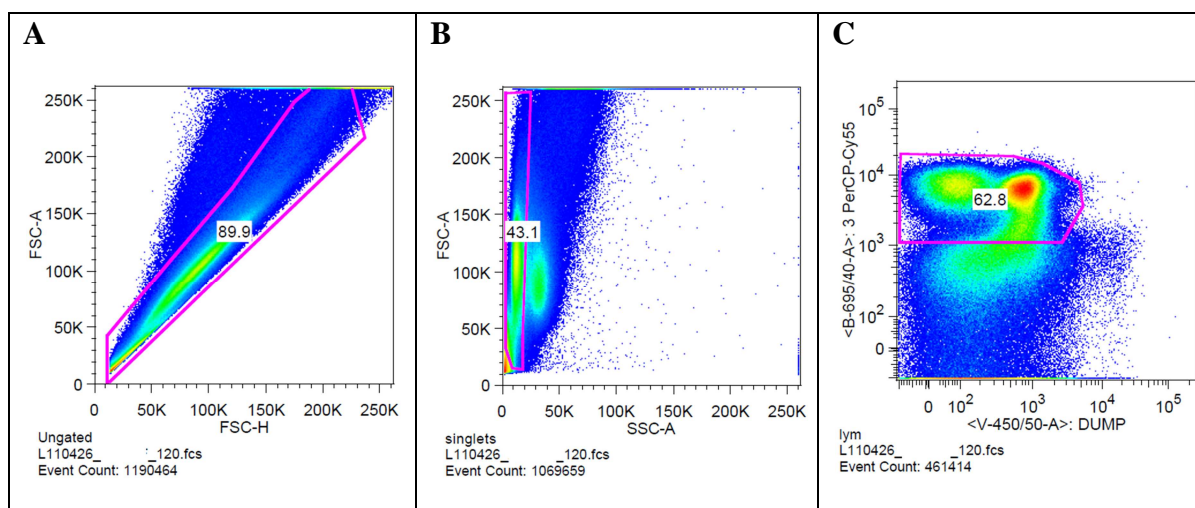
Pro lyzaci zbylých erytrocytů a fixaci T-lymfocytů přidáme do každé jamky 100 μ l BD FACS Lysing Solution a necháme 10 minut inkubovat ve tmě při pokojové teplotě. Následně buňky centrifugujeme při 500g 8 minut. Po centrifugaci slijeme supernatant a přidáme 200 μ l BD FACS Permeabilizing Solution 2, pomocí kterého permeabilizujeme T-lymfocyty. Buňky necháme permeabilizovat 7 minut a následně je opět centrifugujeme při 500g 8minut.

Intracelulární značení

Po permeabilizaci lymfocytů a slítí supernatantu je provedeno jejich značení monoklonálními protilátkami proti intracelulárním znakům 0,5 μ l IFN-g PE-Cy7, 1 μ l IL-2 APC (eBioscience, San Diego, CA, USA) a 4 μ l CD154 PE (Immunotech, Marseille, Francie). Dále přidáme monoklonální protilátky proti dalším povrchovým znakům 4 μ l CD4 ECD (Immunotech) a 5 μ l CD3 PerCP-Cy5,5 (eBioscience). Značení probíhá 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po značení jsou buňky opět promyty promývacím pufrem a centrifugovány 500g 8 minut. Po centrifugaci přidáme do každé jamky 150 μ l promývacího pufru a následně jsou buňky připraveny na měření pomocí průtokového cytometru BD LSR2.

Výběr („gating“) podskupin buněk

Celý obsah každé jamky je nahrán pomocí průtokového cytometru LSR2 (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Analýzu dat provádíme v softwaru FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, USA). Celý výběr podskupin buněk zahájíme pomocí parametrů forward scatter-plocha pod křivkou signálu (FSC-A) proti forward scatter-výška signálu (FSC-H). Tímto výběrem se zbavíme případných dubletů buněk (Obr. 4 A). Ze zbylých událostí dále vybíráme na základě lymfocytárního výběru, pomocí FSC-A proti side scattru (SSC-A) (Obr. 4 B). Ze získaných lymfocytů vybíráme pouze takové, které jsou $CD3^+$ a vyloučíme ty, které jsou buď $CD14^+$, $CD20^+$ nebo LIVE/DEAD Violet Viability dye pozitivní (Obr. 4 C). Tímto výběrem se zbavíme všech zbylých granulocytů, B-buněk a mrtvých buněk, čímž se nám sníží případné pozadí a zbavíme se nežádoucích falešně značených událostí. Následuje výběr a identifikace $CD4^+$ a $CD8^+$ subpopulací T-buněk z $CD3^+$ výběru. V každé subpopulaci $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů následně vytvoříme výběry pro každý znak jejich funkčnosti, tedy pro $INF-\gamma$, $CD107a$, $CD154$ a $IL-2$. Když jsou vybrány veškeré funkční znaky, použijeme Booleanskou logiku k tomu, abychom vytvořili všechny možné kombinace jednotlivých odpovědí. Vznikne nám tedy celkem šestnáct modelů, které odpovídají kombinaci testování čtyř funkcí na každé T-buňce.



Obr. 4: Příklad výběru subpopulací, (A) výběr jednotlivých buněk s odstraněním dubletů, (B) výběr lymfocytů, (C) výběr $CD3^+$ lymfocytů.

3.8. Statistická analýza

Od všech měření intracelulárních cytokinů ve specificky stimulované jamce pomocí CMV antigenů bylo odečteno pozadí na základě naměřených hodnot v nestimulované jamce. Spodní práh jsme nastavili nad jednu směrodatnou odchylku na základě změřených dat u zdravých CMV-seronegativních dobrovolných dárců (Tabulka 3). Hodnoty, které tento práh nepřesáhly, byly nastaveny na nulu (Betts et al. 2006).

Tabulka 3: Základní charakteristiky zdravých dárců

Parametr	
Počet zdravých dárců	57
Věk – medián let (rozpětí)	17 (5 – 46)
Dospělí – medián let (rozpětí)	29 (24 – 46)
Děti – medián let (rozpětí)	15 (5 – 18)
CMV serostatus, počet dárců (%)	
Dospělí pozitivní	15 (26,3)
Dospělí negativní	4 (7,0)
Děti pozitivní	13 (22,8)
Děti negativní	25 (43,9)

Ke zjištění statistické významnosti mezi jednotlivými skupinami jsme použili Mann-Whitney-Wilcoxonův test. Za významné jsme považovali p-hodnoty nižší než 0,05. Takto jsme porovnali celkem 15 primárních T-buněčných odpovědí na CD4⁺ a stejné množství odpovědí na CD8⁺ T-lymfocytech. Porovnávali jsme mezi sebou jednotlivé skupiny CMV-kontrolujících a nekontrolujících pacientů.

K vytvoření klasifikačního stromu jsme použili modifikovaný C4.5 algoritmus (Kotsiantis 2007), který jsme využili jako statistický klasifikátor k přehlednému oddělení jednotlivých proměnných sestupně od statisticky nejvýznamnějších proměnných až po méně významné. V každém uzlu stromu C4.5 algoritmus vybírá jednu proměnnou, která co nejefektivněji rozdělí data do dvou podskupin. Jediné kritérium, které rozhoduje o efektivitě rozdělení dat, je normalizovaný zisk informace. Je vybráno vždy takové rozdělení, kdy je zisk normalizované informace nejvyšší. Normalizovaný zisk informace je nesymetrická míra,

která určuje pravděpodobnostní odlišnosti od dvou možných rozdělení (Kullback & Leibler 1951). Veškerá statistická analýza dat byla prováděna v softwaru R-project (www.r-project.org, Statistics Department of the University of Auckland, USA). K třídění dat pomocí C4.5 algoritmu byl použit software R-project s RWeka package (dostupným na <http://cran.r-project.org/web/packages/RWeka/index.html>).

3.9. Měření degranulace NK-buněk

Pro měření degranulace používáme ke stimulaci buněčnou CML linii K562, která má chromozomální translokaci *BCR-ABL1*, a na svém povrchu neexprimuje žádné MHC receptory, čímž je vhodná jako cíl pro NK-buňky. Tuto linii jsme získali z German National Resource Centre for Biological Material (DSMZ, SRN).

Stimulace NK-buněk

NK-buňky vyizolované pomocí metody RosetteSep nejprve naředíme na 4 milióny/ml a následně rozdělujeme po 100 μ l do jamek na 96-v-jamkové destičce. Do první jamky přidáváme spolu s NK-buňkami ještě 100 μ l kultivačního média a používáme ji jako negativní kontrolu. Do druhé jamky přidáváme k NK-buňkám 100 μ l K562 buněk, které jsme předem naředili na 2 milióny/ml. Do všech jamek dále přidáme 2 μ l protilátky proti CD107a Alexa488 (1 μ g/ml, Exbio Praha).

Povrchové značení

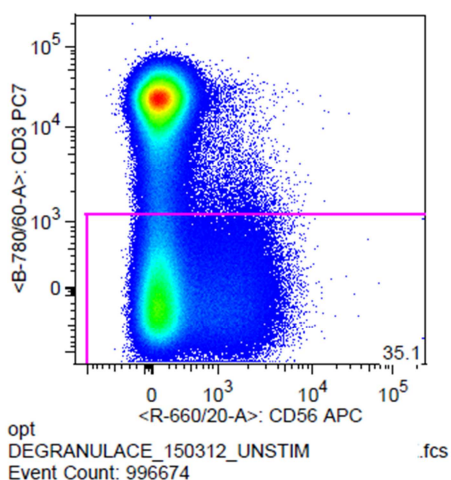
Po dvouhodinové stimulaci je obsah jamek na 96-v-jamkové destičce přenesen do FACS zkumavek pomocí PBS s 2mM EDTA. Obsah zkumavek stočíme (450g, 3 minuty, 25°C) a slijeme supernatant. Do jednotlivých zkumavek přidáme 33 ml PBS pufru, a 5 μ l protilátky CD3 PC-7 (Becman Coulter), 5 μ l CD56 APC, 2 μ l CD107a A488 (Exbio Praha) a 5 μ l CD16 PE (BD San Jose) a necháme inkubovat ve tmě při pokojové teplotě 20 minut.

Po inkubaci s povrchovými protilátkami doplníme zkumavky do 3ml pomocí PBS pufru, abychom odstranili nenavázané protilátky a zredukovali tak pozadí, a následně

centrifugujeme při 450g 3minuty za pokojové teploty. Po centrifugaci slijeme supernatant, přidáme 100 μ l PBS pufru a měříme na průtokovém cytometru BD LSR2.

Výběr podskupin buněk

Celý obsah FACS zkumavek je nahrán pomocí průtokového cytometru BD LSR2 a následná analýza FCS dat je prováděna ve FlowJo softwaru. Analýzu degranulace zahájíme výběrem lymfocytů na základě FSC-A a SSC-A. Z lymfocytů pak dále vybíráme pouze takové, které nejsou CD3⁺ za pomoci CD3⁺ událostí proti CD56⁺ událostem (Obr. 5). Nyní nás zajímají NK-buňky a ty získáme výběrem pouze CD56⁺ a CD16⁺ události za použití zobrazení pouze CD56 proti CD16. Na takto vybraných NK-buňkách měříme míru degranulace pomocí intenzity znaku pro CD107a a porovnááme jeho intenzitu na nestimulovaných buňkách proti stimulovaným buňkám, což nám mezi nimi umožní vidět rozdíly a také tím odhalíme případnou nefunkčnost eseje.



Obr. 5: Příklad výběru NK-buněk.

3.10. Stanovení cytotoxicity NK-buněk

Vyizolované NK-buňky pomocí metody RosetteSep nejprve naředíme na 2 milióny/ml a následně rozdělíme po 100 μ l do jamek na 96-v-jamkové destičce. Do první jamky přidáváme 100 μ l K562 buněk, které jsme před tím naředili na koncentraci 200 000/ml a 100 μ l kultivačního média. Tuto jamku používáme jako nestimulovanou kontrolu,

abychom zjistili jaká je přirozená úmrtnost K562 buněk. Do vedlejší jamky přidáme 100 μ buněk K562 o stejné koncentraci jako do první a k nim přidáme 100 μ l vyizolovaných NK-buněk. V této jamce budeme pozorovat úmrtnost buněk K562 a podle toho odvodíme schopnost vyizolovaných NK-buněk cytotoxického zabíjení.

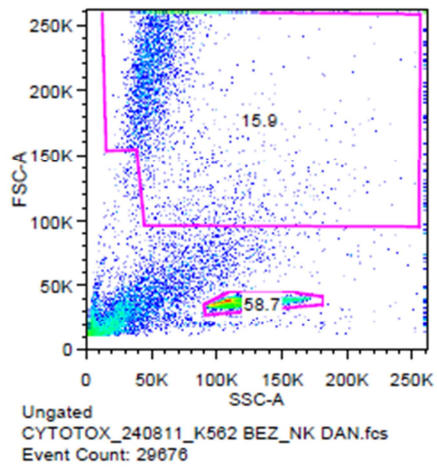
Povrchové značení

Takto připravenou destičku necháme tři hodiny inkubovat v inkubátoru při 37°C, 5% CO₂. Po třech hodinách přidáme do každé jamky 1,25 μ l CD33 APC (Exbio Praha), 1 μ l Syto 41 (Invitrogen), 10 μ l Annexinu 5 FITC, 10 μ l propidium jodidu (PI) a 20 μ l cytocount (Beckman Coulter). Takováto kombinace protilátek a interkalačních barviček nám umožňuje měřit míru apoptózy u K562 buněk. Apoptóza (programovaná buněčná smrt) je fyziologický proces charakterizovaný ztrátou mezibuněčných spojení, ztrátou asymetrie buněčné membrány, kondenzací cytoplasmy a jádra. Jedním z prvních znaků apoptózy je translokace membránového fosfolipidu fosfatidylserinu (PS) z vnitřní na vnější stranu buněčné membrány, který je tzv. „eat-me“ signálem pro makrofágy. Antikoagulant Annexin V (zde konjugovaný s fluorochromem) se váže na záporně nabitě fosfolipidy, jako je PS apoptotických buněk, což umožňuje jejich identifikaci na průtokovém cytometru (Koopman et al. 1994). Annexin V používáme v kombinaci s DNA vazebnou fluorescenční próbou – propidium jodidem (PI), který prochází do buněk až po porušení membránové integrity a tudíž je znakem pozdně apoptotických a mrtvých buněk (Smolewski et al. 2002). Přidaný cytocount umožňuje spočítat konkrétní koncentrace a počty buněk při vstupu do experimentu, a tím zjistit absolutní počty jak NK-buněk, tak K562 buněk. Takto označené buňky necháme 20 minut inkubovat ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci jsou buňky připraveny na měření pomocí průtokového cytometru BD LSR2.

Výběr podskupin buněk

Změřené a nahrané buňky analyzujeme v softwaru FlowJo. Analýzu zahájíme výběrem buněk K562 v lymfocytárním výběru za pomoci FSC-A proti SSC-A (Obr. 6). Na takto vybraných buňkách sledujeme míru apoptózy pomocí výběru subpopulací na základě CD33 proti Annexinu V a CD33 proti PI. První výběr poskytuje informaci o buňkách, které jsou v časně fázi apoptózy a pomocí druhého výběru získáme informaci a množství buněk,

které jsou v pozdní fázi apoptózy. Po výběru všech podskupin provádíme porovnání mezi stimulovanou jamkou a nestimulovanou, čímž zjistíme zvětšení míry vstupu buněk K562 do apoptózy a můžeme tak posoudit míru cytotoxického efektu NK-buněk.



Obr. 6: Příklad výběru buněk K562.

4. VÝSLEDKY

4.1. Rekonstituce imunitních funkcí

V rámci své diplomové práce jsem se zabýval rekonstitucí imunitních odpovědí u pacientů po transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Zaměřil jsem se jednak na funkční odpověď lymfocytů na infekci CMV a na všeobecnou funkční odpověď lymfocytů po stimulaci CD3 receptoru. Expres CD3 antigenu je přítomna na membráně zralých T-lymfocytů a tudíž po jeho stimulaci dochází k všeobecné funkční odpovědi (Paredes-Aguilera et al. 2001). Degranulační esej, zavedenou na T-lymfocytech, jsem dále adaptoval pro stanovení degranulace NK-buněk pro identifikaci pacientů s defektem degranulace.

4.2. Charakteristika pacientů

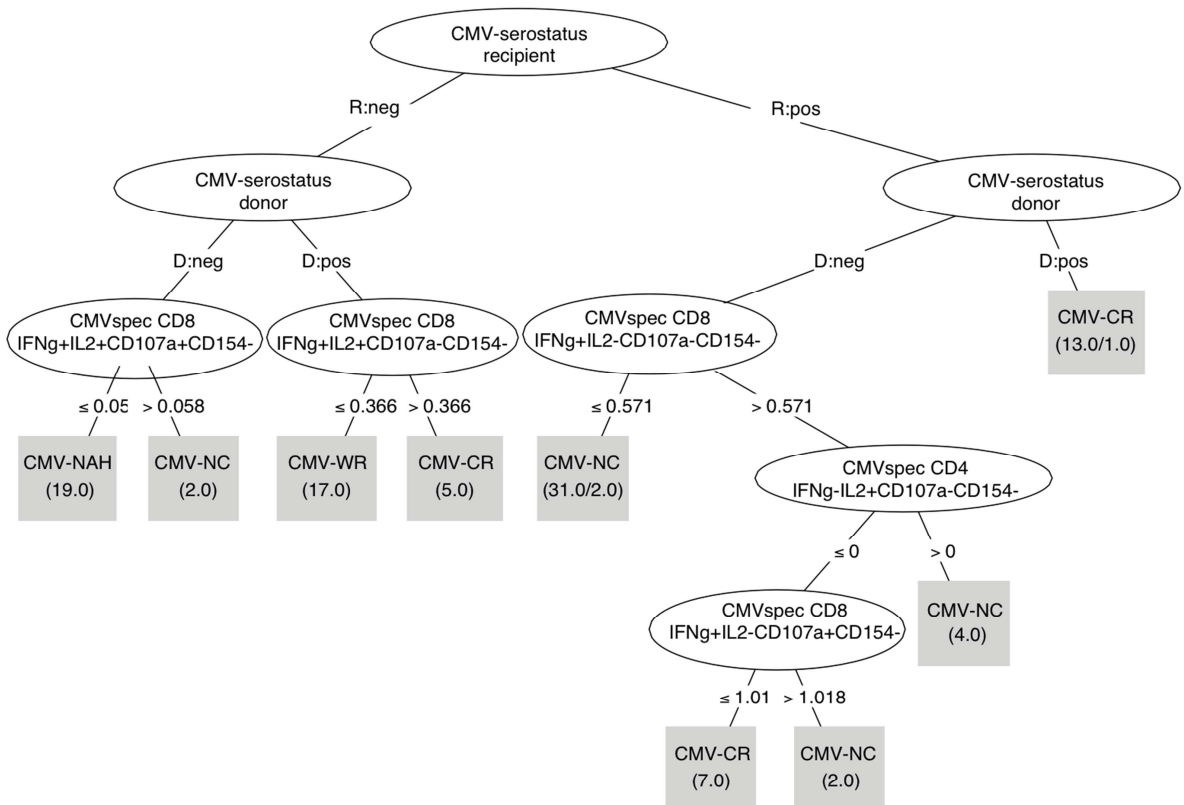
Pro statistickou analýzu jsme použili všechna naměřená data ze všech tří kohort, abychom měli co největší statistickou vypovídací hodnotu. Cytometrická data od všech pacientů jsme spojili s daty klinickými a s daty z PCR vyšetření virové nálože. Z výsledných dat jsme dále analyzovali pouze ty pacienty, u nichž jsme měli kompletní informace ze všech tří vyšetření. Výsledná kohorta obsahovala 63 pacientů, u nichž jsme měli celkem 470 cytometrických vyšetření. Základní charakteristiky těchto pacientů uvádí Tabulka 4.

Tabulka 4: Vybrané charakteristiky pacientů zahrnutých do statistické analýzy

základní charakteristiky souboru pacientů		
počet pacientů	63	
věk pacientů (medián)	11	
věk pacientů (průměr ± sm. odch.)	12,3 ± 6,4	
věk v době HSCT (průměr ± sm. odch.)	9,1 ± 6,1	
věk v době vyšetření (průměr ± sm. odch.)	10,1 ± 6,3	
pohlaví (muži/ženy)	38/25	
příčina transplantace	počet pacientů	procenta
akutní lymfoblastická leukémie	14	22,3
akutní myeloidní leukémie	6	9,5
myelodysplastický syndrom	8	12,7
ostatní	35	55,5
CMV serostatus před HSCT	počet pacientů	procenta
D-/R-	11	17,5
D-/R+	32	50,8
D+/R+	15	23,8
D+/R-	5	7,9

4.3. Proměnné kontrolující CMV reaktivaci

Veškeré klinické proměnné byly testovány na schopnost kontrolovat CMV reaktivaci. Ukázalo se, že pouze serostatus dárce je jedinou proměnnou, která vyšla signifikantně při kontrole CMV reaktivace. Překvapivě nám nevyšel jako signifikantní efekt akutní GvHD a ani chronické GvHD. Všechny klinické proměnné jsme testovali pomocí C4.5 algoritmu, který rozděluje data do skupin vždy podle nejlepší možné proměnné, která má v danou chvíli nejvyšší normalizovanou vypovídací hodnotu (Kotsiantis, 2007). Tímto způsobem jsme na patientské kohortě 1 vytvořili klasifikační strom (Obr. 7), na kterém je vidět, že proměnnou s nejvyšší vypovídací hodnotou je serostatus příjemce a za ním hned následuje serostatus dárce. Dále nám tato analýza umožnila jednoduše najít další proměnné, které hrají významnou roli v tom, zda pacient bude CMV reaktivaci kontrolovat či nikoliv (např. duální produkce INF- γ a IL-2 na CD8+ buňkách, nebo na stejných buňkách produkce pouze INF- γ).



Obr. 7: Klasifikační strom. Pomocí C4.5 algoritmu jsme rozdělili proměnné, podle jejich nejvyšších vypovídacích hodnot. Nahoře jsou nejsignifikantnější proměnné a směrem dolů se jejich vypovídací hodnota postupně snižuje. R, příjemce, D, dárce, uvedená čísla odpovídají hraničním procentuálním výskytům jednotlivých populací pro rozřazení do dalších skupin.

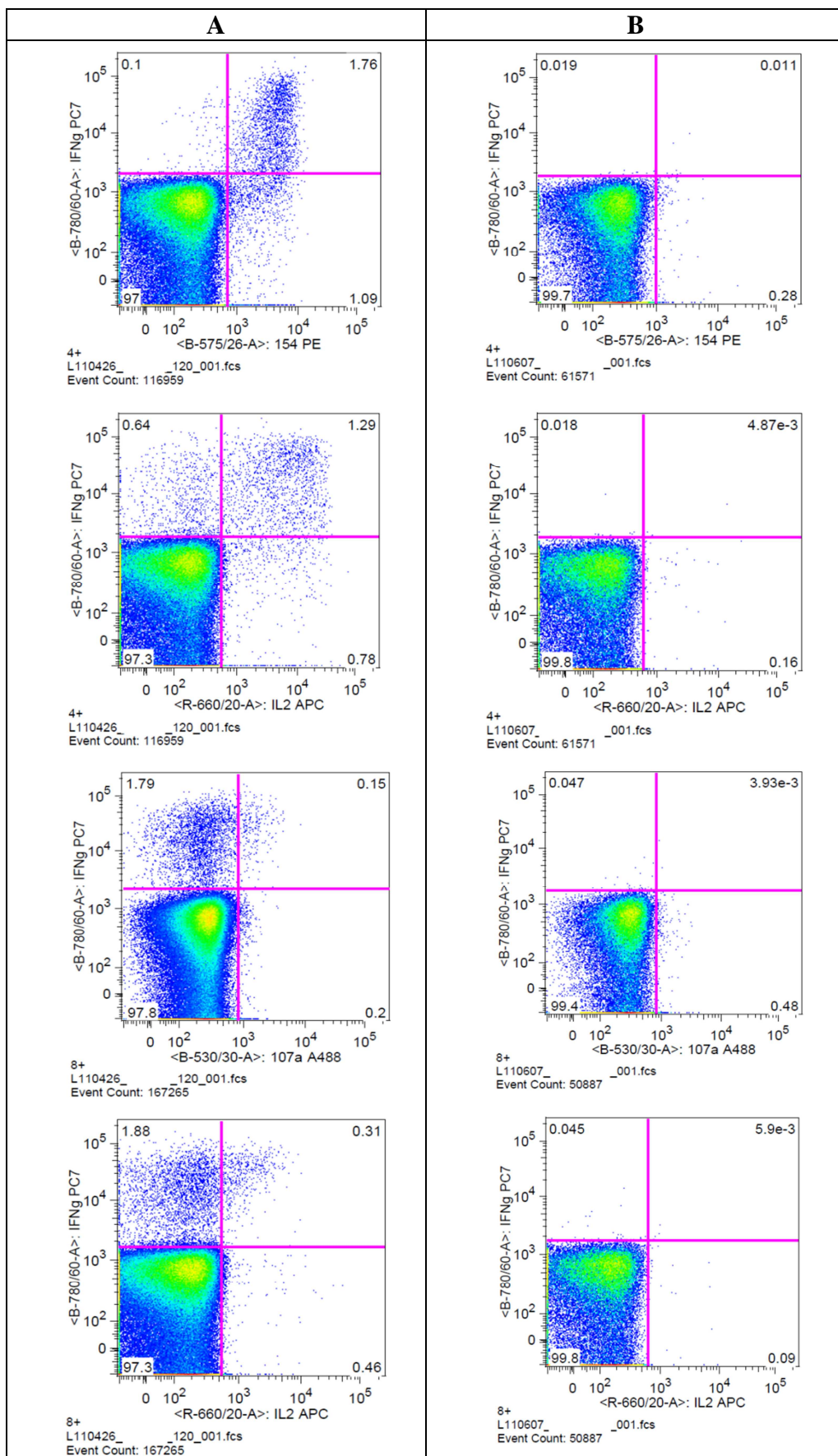
4.4. Ověření funkčnosti testování T-lymfocytů

Před použitím námi zvolené metody testování funkčnosti T-lymfocytů, bylo potřeba ověřit její funkčnost. K odečtu pozadí od specificky stimulovaných vzorků, jsme použili data z nestimulované jamky. Během našeho testování jsme se nesetkali s tím, že by patientský vzorek byl stimulován vnějšími vlivy již před vstupem do testu, a tudíž bychom ho na základě odpovědi v nestimulované jamce museli z analýzy vyloučit. Avšak během testování jsme se setkali několikrát s případem, kdy jsme nedetekovali odpověď v nespecificky stimulované jamce. Tato skutečnost mohla být způsobena na základě dvou jevů:

1. Pacient byl časně po transplantaci a jeho T-lymfocyty ještě nebyly natolik zralé, aby byly schopné jakékoliv funkční odpovědi.
2. Díky různým vnějším vlivům, ať už nesprávnou manipulací se vzorky nebo reagensy během experimentu, nebo nefunkčností jedné nebo více protilátek, jsme nebyli schopni detekovat jeden nebo více znaků funkční odpovědi T-lymfocytů.

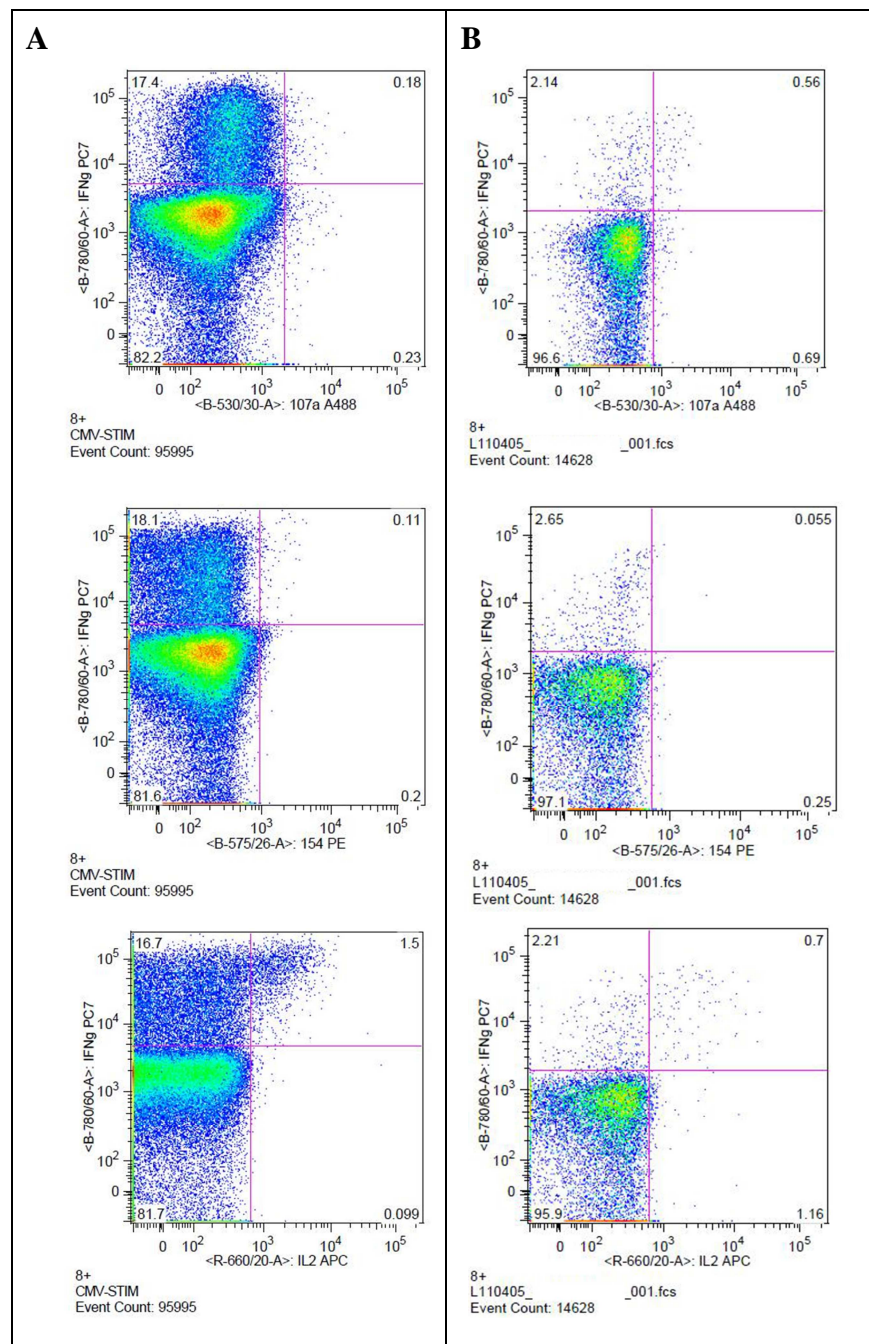
První jev nijak neovlivňuje funkčnost testu a pouze ukazuje na nefunkčnost patientských T-lymfocytů. Jelikož během jednoho experimentu měříme najednou vzorky od více pacientů, kteří jsou v různých časových bodech po transplantaci, zjistíme tuto skutečnost tím, že vidíme odpověď u jiných pacientů. V takovémto případě naměřené vzorky dále zahrnujeme do další analýzy. Ovšem pokud nejsme schopni detekovat odpověď ani u jiných pacientů ve stejném experimentu, jedná se s největší pravděpodobností o druhý jev a v tomto případě s naměřenými daty dále nepracujeme a z analýzy je vyloučíme.

Dále bylo potřeba zjistit, zda jsme schopni detekovat rozdíly ve stimulaci mezi CMV-seropozitivními, reaktivaci kontrolujícími a seronegativními pacienty. Tato skutečnost byla ověřena hned na začátku testování na zdravých pacientech jak seropozitivních, tak seronegativních (Obr. 8). Jak je vidět na obrázcích, tak seropozitivní pacienti mají T-lymfocyty odpovídající na stimulaci CMV antigenem, zatímco T-lymfocyty seronegativních pacientů na tuto stimulaci nereagují.

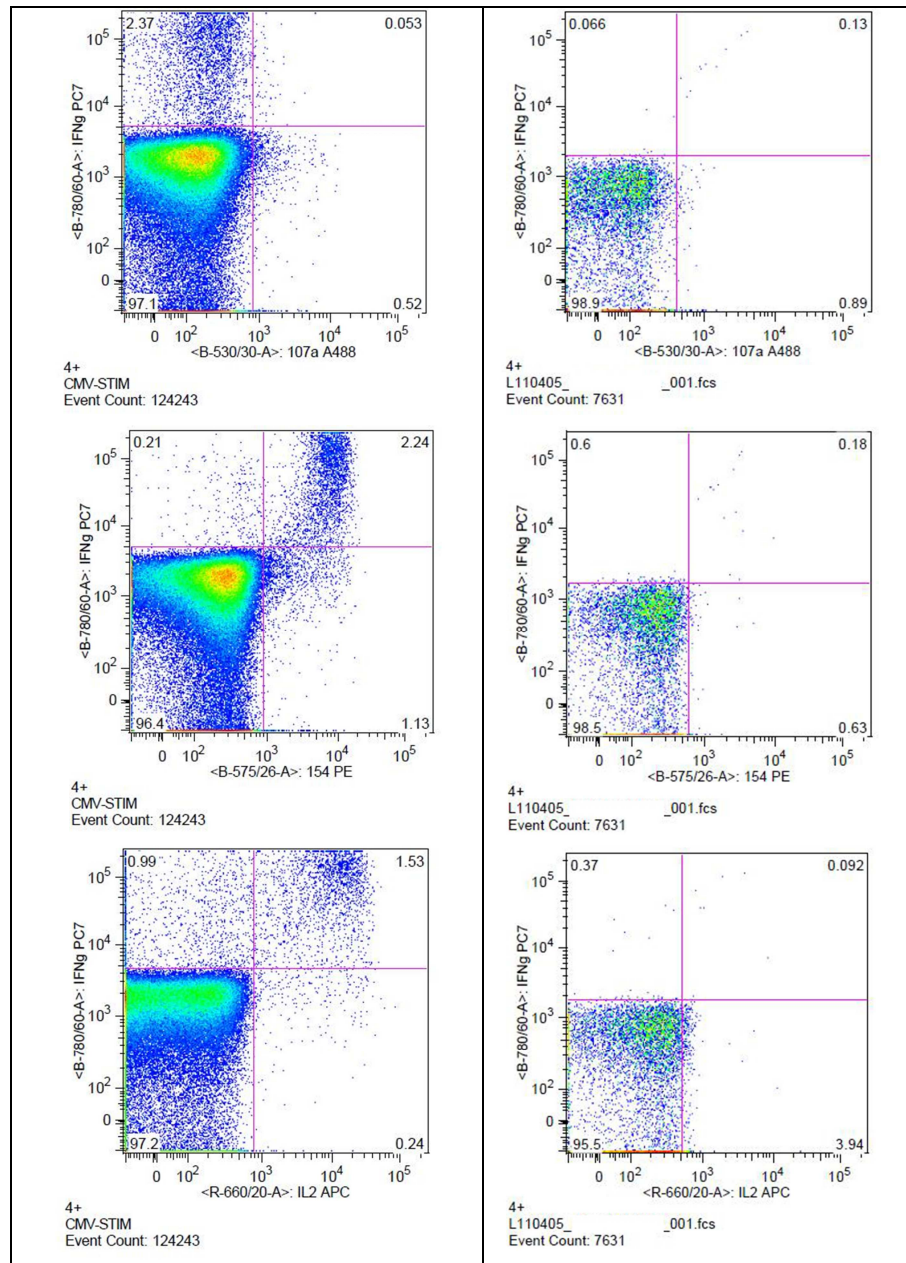


Obr. 8: Příklad výsledků stimulace CMV antigeny u zdravých (A) seropozitivních, (B) seronegativních pacientů.

Appay et al. (2008) navrhli, že kvalita buněčné odpovědi (na rozdíl od pouhé četnosti odpovídajících buněk) a kombinace optimálních podtypů T-buněk jsou významnými parametry, aby byla umožněna imunologická kontrola jakéhokoliv patogenu (Appay et al. 2008). To odpovídá i našim výsledkům a jak je vidět na obrázku níže (Obr. 9). Pacient, který kontroluje CMV infekci, má na rozdíl od pacienta, který CMV infekci nekontroluje, zvýšenou tvorbu INF- γ a IL-2 na CD8⁺ T-lymfocytech a zároveň zvýšenou produkci IL-2 na CD4⁺ T-lymfocytech.



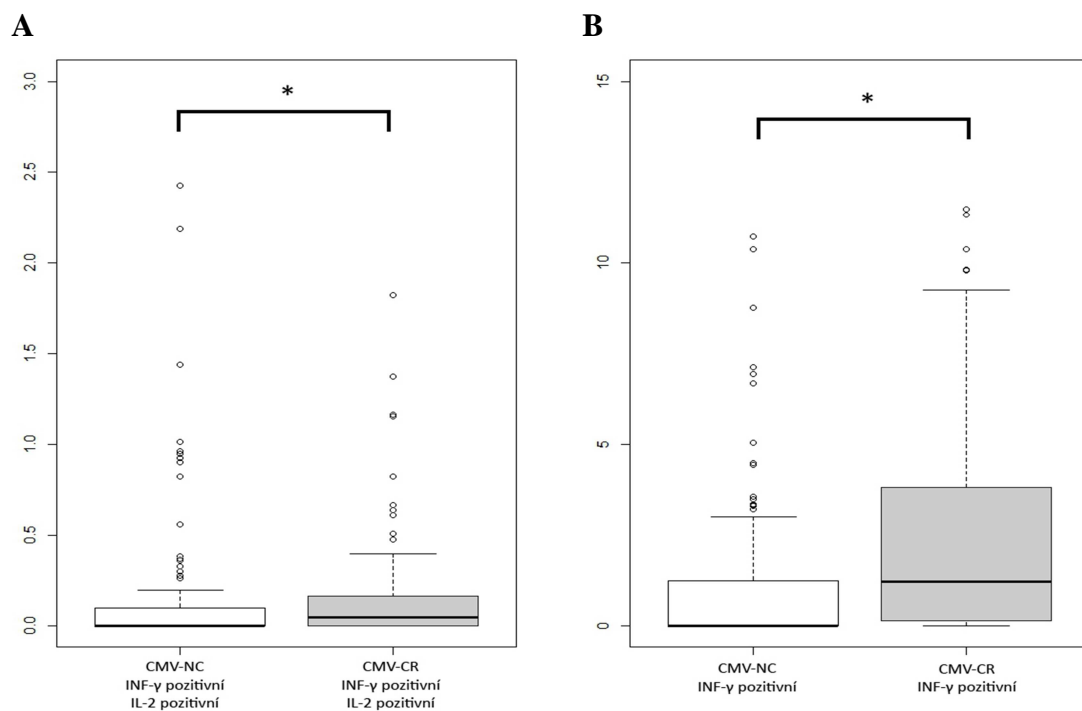
Obr. 9: Rozdíly v expresi jednotlivých znaků na CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocytech u (A) CMV-CR, (B) CMV-NC pacienta.



Obr. 9 (pokračování): Rozdíly v expresi jednotlivých znaků na CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocytech u (A) CMV-CR, (B) CMV-NC pacienta.

Byly navrženy funkční znaky na CMV-specifických T-buňkách u zdravých CMV-seropozitivních dárců, kteří dobře kontrolují CMV reaktivaci (Harari et al. 2006). Avšak pacienti po HSCT mají mnohem vyšší CMV virové nálože a trpí častými CMV reaktivacemi, jelikož mají vážnou lymfopenii, která je způsobena právě předtransplantační přípravou (Limaye et al. 2001). Ve své práci jsem srovnal funkční profilové znaky u CMV-CR a CMV-NC skupin pacientů. Mezi CD8⁺ lymfocyty jsem našel dva funkční znaky

(pouze $\text{INF-}\gamma$ + a duální $\text{INF-}\gamma$ + a IL2+), které se významně liší mezi CMV-CR a CMV-NC (Obr. 10). Ukazuje se, že pouze $\text{INF-}\gamma$ pozitivní buňky tvoří nejspíše první linii obrany, která je závislá na kontaktu s antigenem a je nejspíše esenciální pro úspěšnou odpověď na infekci. Ovšem přítomnost pouze těchto buněk nemusí být dostatečná, pokud nejsou podpořeny ostatními funkčními podtypy T-lymfocytů. Díky tomu, že duálně pozitivní buňky na $\text{INF-}\gamma$ a IL-2 byly přítomny ve všech kontrolujících pacientech, ale v podstatě se nevyskytují u nekontrolujících pacientů, jsme jim přisoudili funkci "CD8 hlavní" CMV-kontrolující podtyp.

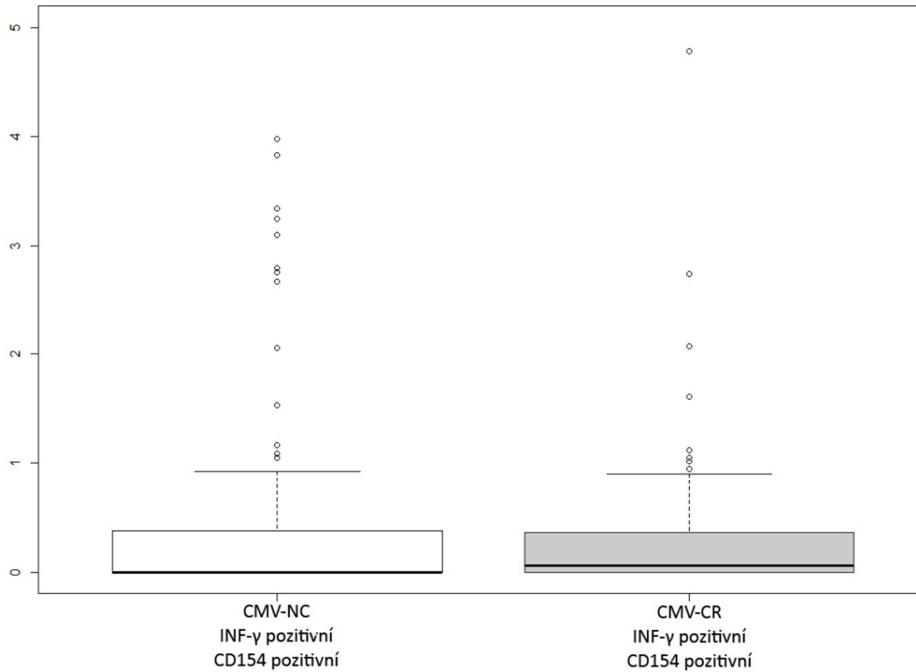


Obr. 10: Rozdíly v produkci na CD8^+ T-lymfocytech u CMV-NC a CMV-CR pacientů (A) duální $\text{INF-}\gamma$ + a IL2+ (B) $\text{INF-}\gamma$ +, na ose y jsou vynesena procenta výskytu na CD8^+ T-lymfocytech, * značí p-hodnotu $< 0,05$.

Mezi CD4^+ buňkami jsme nenašli žádnou podskupinu buněk, která by se významně lišila mezi CMV-CR a CMV-NC pacienty.

Nejpočetnější specifickou odpovědí u CD4^+ buněk byla odpověď produkcí $\text{INF-}\gamma$ a zvýšenou expresí CD154 (Obr. 11). Tato duální produkce byla doprovázena IL-2 v druhé nejčastější podskupině CD4^+ buněk. Ačkoliv se produkce těchto cytokinů vyskytovala

častěji u CMV seropozitivních zdravých jedinců, byla také přítomna jak u CMV-CR tak u CMV-NC pacientů.

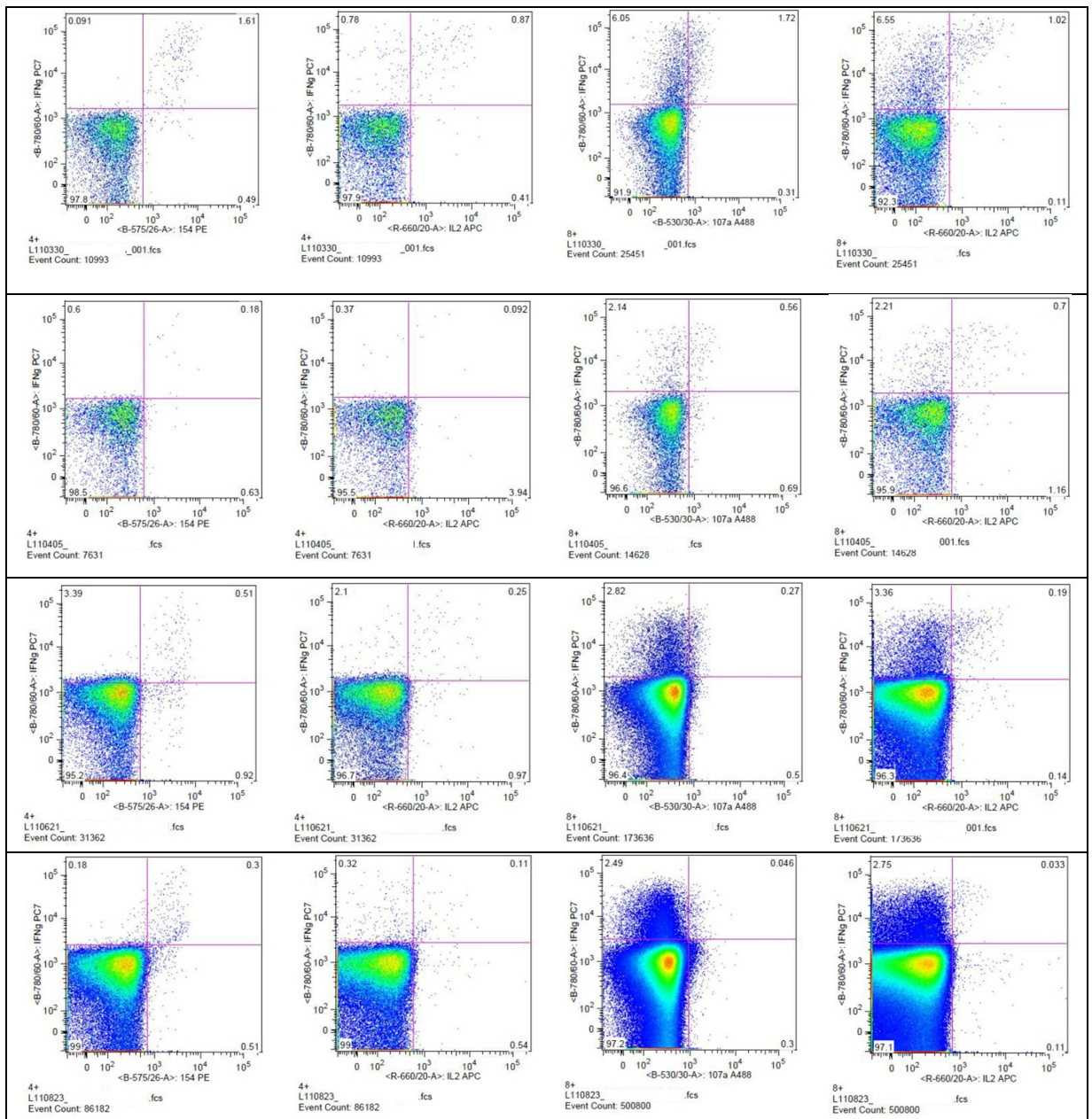


Obr. 11: Procentuální zastoupení INF-γ+ CD154+ CD4⁺ T-lymfocytů u CMV-NC a CMV-CR pacientů.

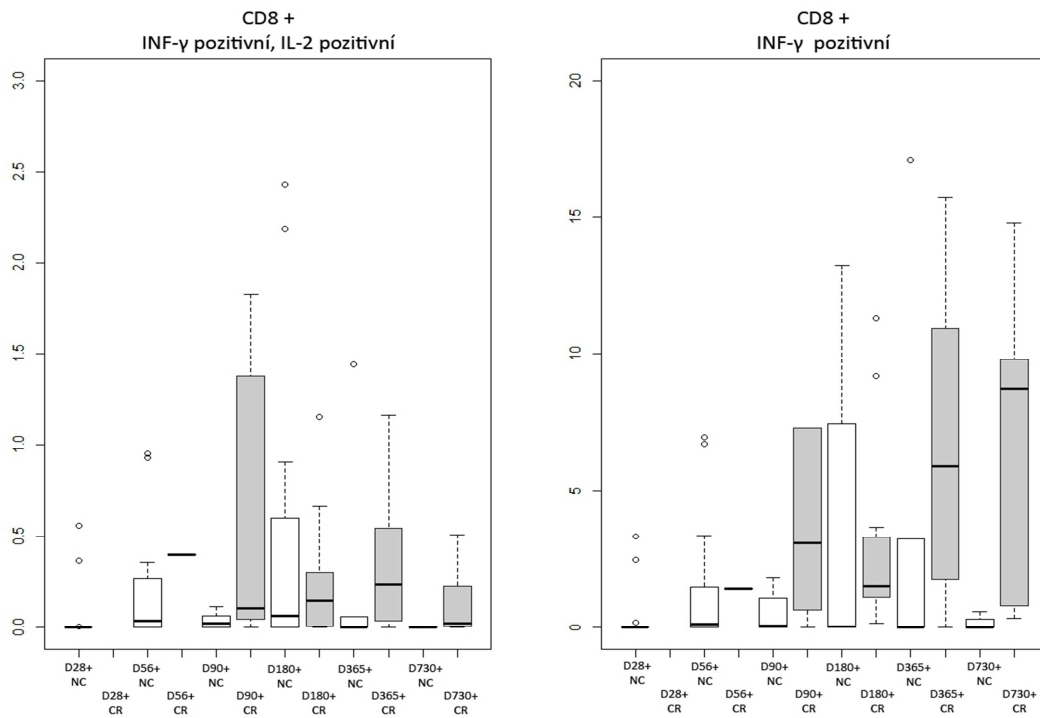
4.5. Obnova imunitních funkcí v časových bodech po transplantaci

K tomu, abychom určili, zda je doba po transplantaci relevantním faktorem, který by měl být zahrnut do analýzy, jsme rozdělili všechny pacienty do šesti skupin podle dnů po transplantaci: D28+, D56+, D90+, D180+, D365+ a D760+. V jednotlivých časových bodech nás zajímala změna funkční odpovědi po CMV stimulaci antigenem a dále, ve kterém časovém bodu dojde u pacienta ke kontrole reaktivace, aniž by musela být podávána antivirotika (Obr. 12). Dále jsme statisticky vyhodnotili rozdíl odpovědí po stimulaci CMV antigenem mezi CMV-CR a CMV-NC. Konkrétně nás zajímaly rozdíly na CD8⁺ buňkách, produkujících buď pouze INF-γ nebo s duální produkcí INF-γ a IL-2. Dále jsme sledovali rozdíly sumy všech zkoumaných znaků jak na CD4⁺ tak na CD8⁺ buňkách. Jak je vidět na obrázku (Obr. 13), u pacientů, kteří kontrolují CMV je ode dne 90+ výrazně větší odpověď u CD8⁺ buněk, které produkují INF-γ, než u pacientů kteří CMV

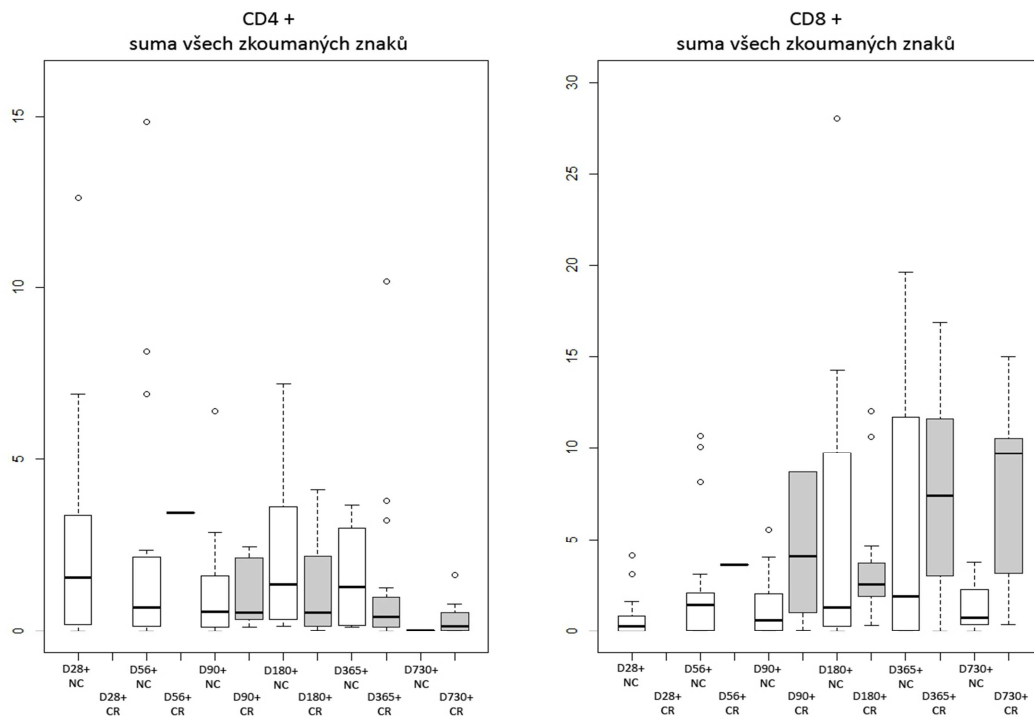
nekontrolují. Tento rozdíl, ale není statisticky významný. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami pacientů u buněk, které mají duální produkci INF- γ a IL-2 nejsou tak výrazné, ale jsou patrné. Při porovnávání sumy všech zkoumaných znaků je vidět opět vyšší odpověď u CMV-CR pacientů než u CMV-NC. Nejvýraznější je rozdíl odpovědi u CD8⁺ T-lymfocytů, u CD4⁺ T-lymfocytů nebyly patrné větší rozdíly (Obr. 14).



Obr. 12: Ukázka obnovy specifické T-lymfocytární odpovědi v časových bodech D28+, D56+, D90+ a D180+ po transplantaci, přičemž každý řádek tabulky znázorňuje jeden časový bod.



Obr. 13: Vývoj specifické odpovědi v časových bodech po transplantaci, srovnání mezi CMV-NC a CMV-CR pacienty. Na ose y jsou vynesena procenta výskytu INF- γ a IL-2 na CD8⁺ T-lymfocytech.



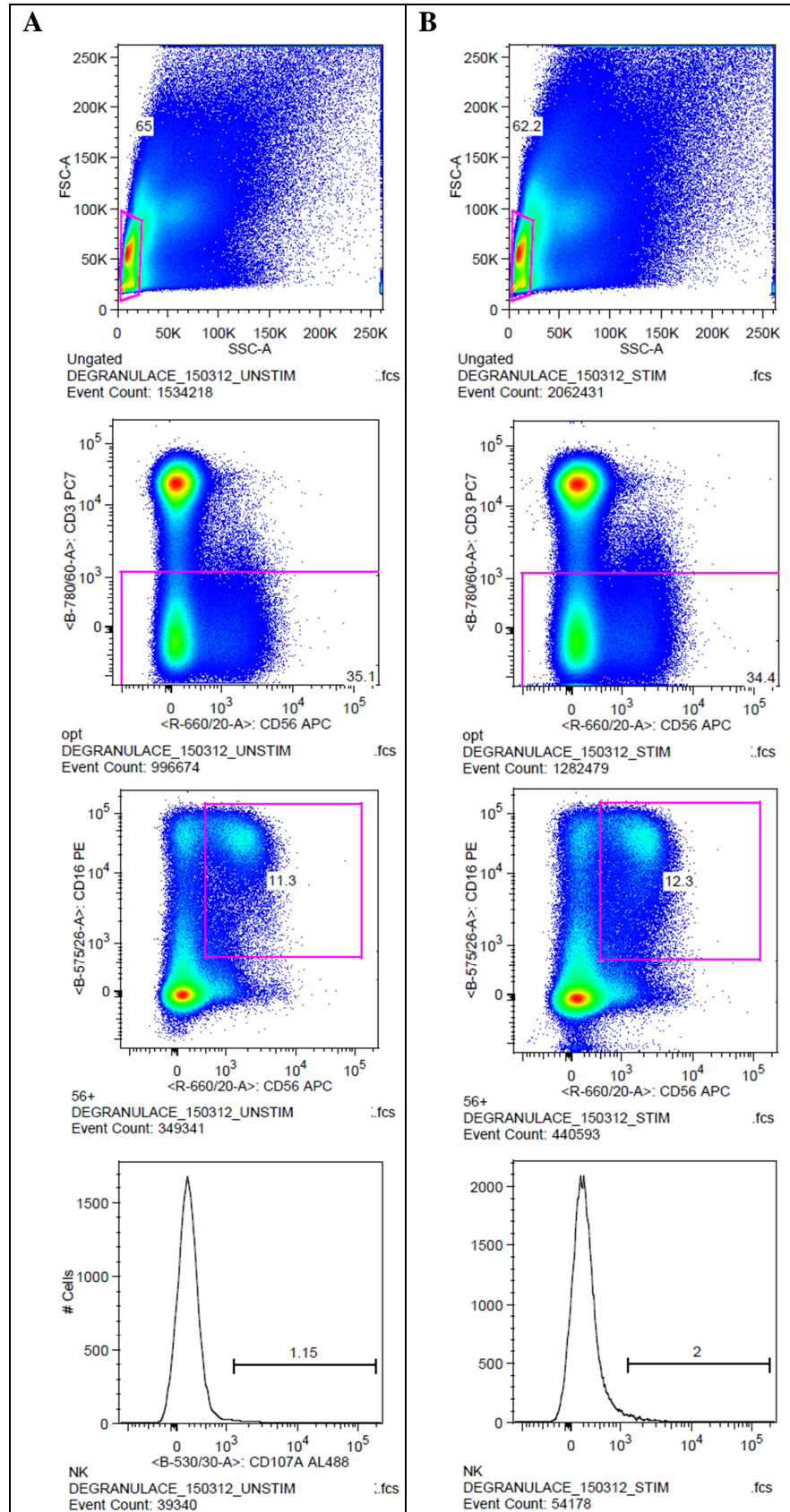
Obr. 14: Porovnání celkové produkce INF- γ , IL-2, CD154 a CD107a u CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů mezi CMV-NC a CMV-CR pacienty.

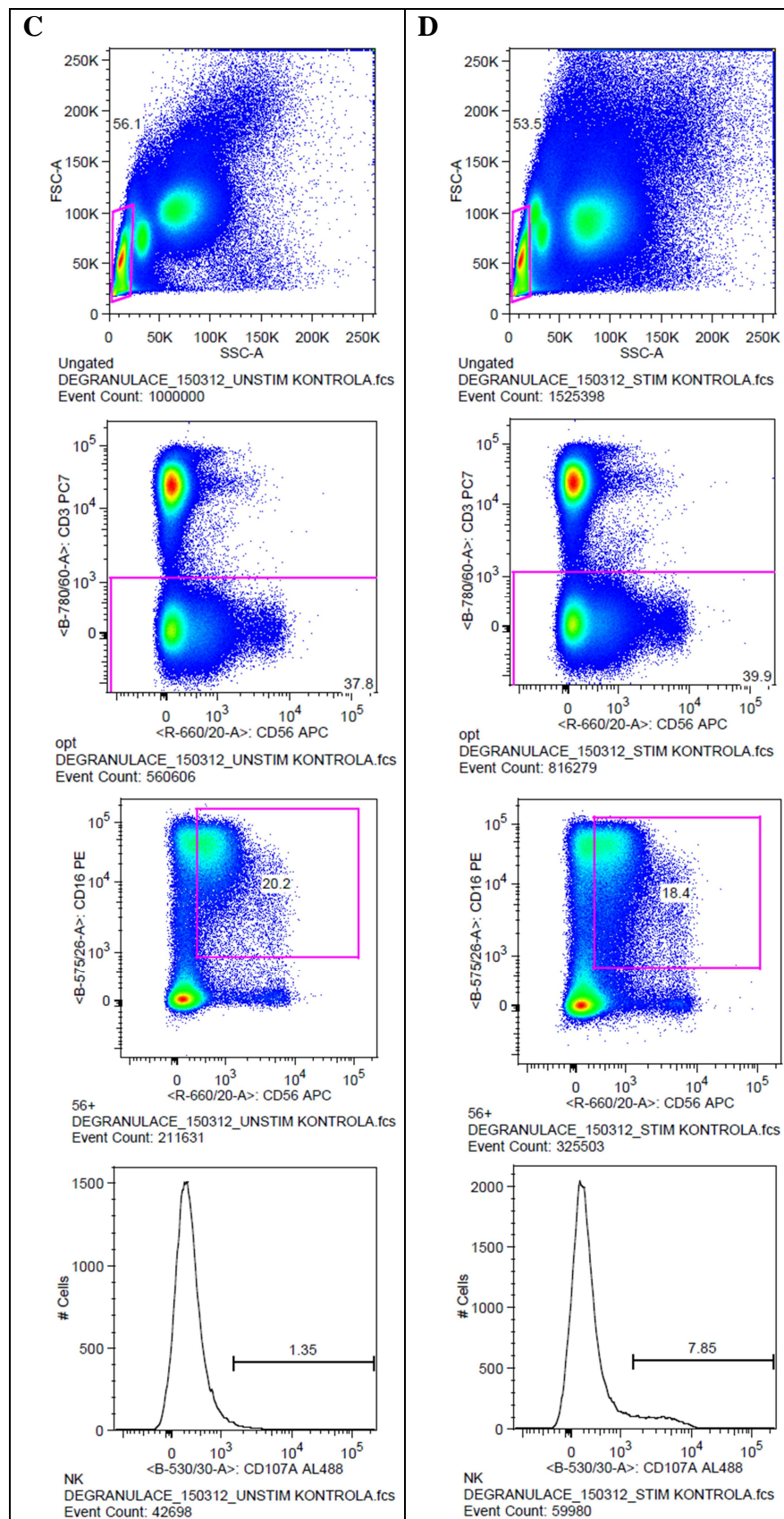
4.6. Degranulační test

Při testování míry degranulace NK-buněk jsme studovali expresi degranulačního znaku CD107a na NK-buňkách jednak zdravých kontrol a jednak na pacientech, kteří měli klinické příznaky imunodeficitu NK-buněk.

K nárůstu exprese znaku CD107a na NK-buňkách dochází již po dvou hodinách inkubace s buňkami K562. U NK-buněk, které nebyly inkubovány s buňkami K562 a tudíž nebyly stimulovány k degranulaci, nebo měly poruchu degranulace, jsme nárůst znaku CD107a nepozorovali. Příklad výsledku je vidět na obrázku degranulace (Obr. 15).

Z takto získaných výsledků, kdy stimulovaná jamka zdravé kontroly má po odečtení pozadí 7,41 krát větší expresi znaku CD107a než stimulovaná jamka vyšetřovaného pacienta je patrné, že námi vyšetřovaný pacient trpí poruchou degranulace NK-buněk. Takováto porucha degranulace ukazuje nejspíše na onemocnění familiární hemofagocytující lymfohistiocytózou (FHL). K přesnému určení podtypu FHL je potřeba naše vyšetření doplnit o genetickou analýzu pacienta, čímž se zjistí, který gen ovlivňující degranulaci má pacient mutovaný.

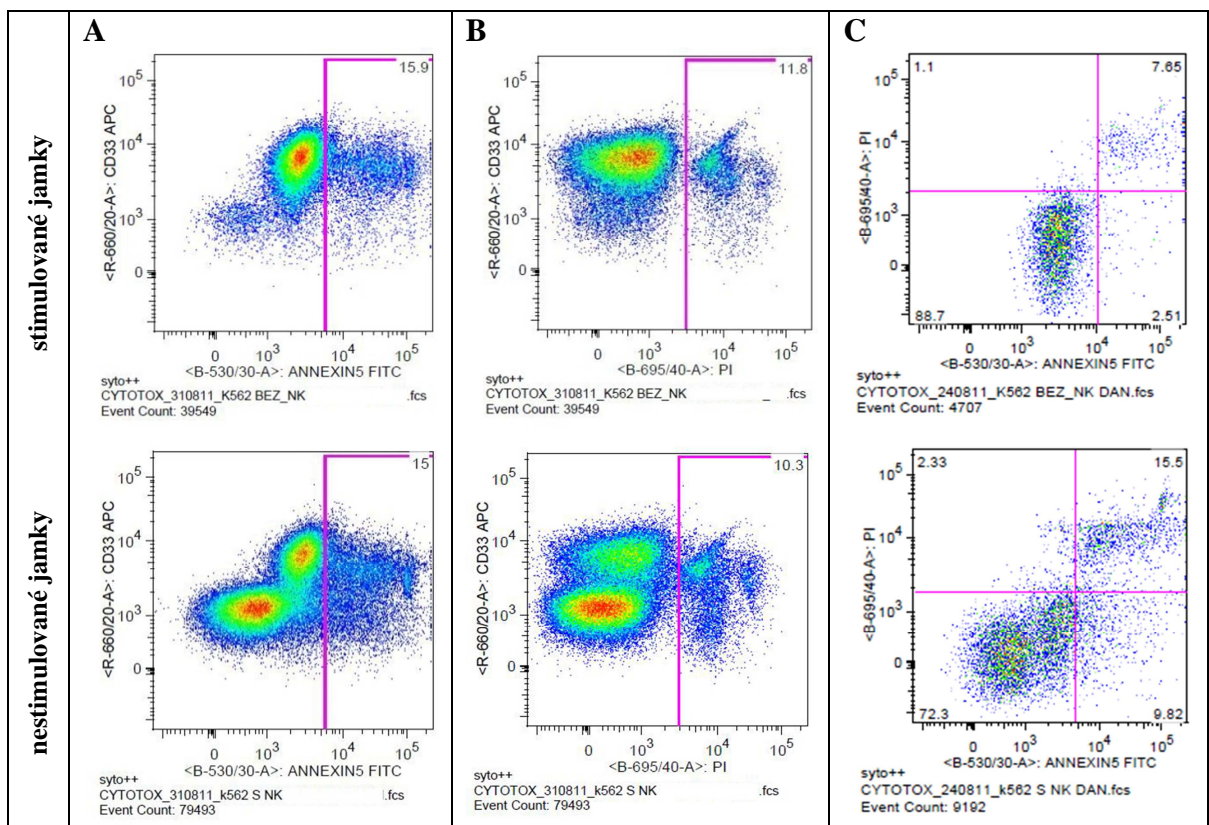




Obr. 15: Výsledek degranulačního testu. A a B ukazují výsledek u pacienta s poruchou degranulace. (A) nestimulovaná jamka, (B) stimulovaná jamka. C a D ukazují výsledek u kontroly prováděné simultánně s vyšetřovaným pacientem. (C) nestimulovaná jamka, (D) stimulovaná jamka. Pacient má 7,41 krát sníženu schopnost degranulace oproti kontrole.

4.7. Cytotoxický test

U testovaných dobrovolných dárců jsme pozorovali zvýšení míry apoptózy buněk K562 po inkubaci s dárcovskými NK-buňkami. Podařilo se nám najít vhodnou dobu stimulace a takové koncentrace buněk K562 a NK-buněk, aby byl cytotoxický test dostatečně průkazný. První testy cytotoxicity se nezdařily nejspíše proto, že jsme měli příliš vysoké koncentrace buněk K562, vzhledem k nízkým počtům cytotoxických buněk, které by byly schopné buňky K562 zabít. Buňky vstupující do apoptózy přirozeně tvořily natolik vysoké pozadí, že jsme nebyli schopni rozpoznat specificky zabíjené K562 buňky. Tento problém jsme však vyřešili snížením koncentrace buněk K562, čímž jsme snížili i pozadí a byli jsme schopni detekovat rozdíly mezi buňkami při vstupu do apoptózy u buněk K562 samotných a u buněk K562 koinkubovaných s NK-buňkami (Obr. 16).



Obr. 16: Optimalizace testu cytotoxicity, (A, B) nedetekovatelné rozdíly umírání buněk K562 v prvních krocích vývoje testu, (C) detekovatelná změna mezi stimulovanou a nestimulovanou jamkou.

5. DISKUZE

Allogení transplantace hematopoetických kmenových buněk se během posledních let stala běžným postupem při léčení pacientů s leukémiemi nebo imunologickými deficity, neboť při ní dochází ke změně celého imunitního systému pacienta. Bohužel tento léčebný postup je zatížen relapsy léčeného onemocnění, nemocí štěpu proti hostiteli nebo vážnými oportunistickými infekcemi, které způsobují většinu úmrtí po HSCT. Snaha o zvýšení obnovy imunitního systému se tak stává předmětem intenzivního zkoumání (Seggewiss & Einsele 2010). Abychom byli schopni podpořit obnovu imunitního systému je potřeba jí nejdříve dobře porozumět, což bylo hlavním cílem této diplomové práce.

5.1. Obnova T-lymfocytů

Při detekci CMV specifických T-lymfocytů navazují na práci v laboratoři CLIP-Cytometrie (kohorta 1 (Król et al. 2011) a kohorta 2), kterou dále prohlubují (kohorta 3). Podařilo se nám najít a popsat funkční znaky na $CD4^+$ a $CD8^+$ buňkách u klinicky relevantních skupin pacientů, ať už kontrolujících nebo nekontrolujících CMV reaktivaci po HSCT. Množství vyšetřených pacientů nám umožnilo stanovit u každé $CD4^+$ nebo $CD8^+$ podskupiny T-lymfocytů klinicky významné ukazatele kontroly CMV reaktivity. Vyhodnocení několika funkcí najednou na jedné buňce nám umožnilo získat přehled o kvalitě protivirové odpovědi, což je velice důležité při určení výsledku CMV reaktivity (Appay et al. 2008, Seder et al. 2008).

Mezi sledované znaky funkční odpovědi na T-lymfocytech patřila produkce cytokinů $INF-\gamma$ a $IL-2$, a exprese povrchových znaků $CD107a$ a ligandu pro $CD40$ ($CD154$). Zajímala nás produkce těchto cytokinů, jelikož $IL-2$ slouží jako růstový, stimulační a diferenciací faktor pro T-lymfocyty. Sekrece $IL-2$ hraje roli při aktivaci CMV specifických $CD8^+$ T-lymfocytů (Jenkins et al. 2001), zatímco $INF-\gamma$ působí jako aktivátor makrofágů, který je sekretován T-lymfocyty na základě rozpoznání antigenu a je velmi důležitý při imunitní odpovědi proti intracelulárním patogenům (Ghanekar et al. 2001). Ve shodě s Gamadia et al. (2004) jsme prokázali, že CMV specifické $CD4^+$ T-lymfocyty mají na svém povrchu zvýšenou expresi molekuly $CD154$, která jim umožňuje interagovat s dendritickými a B-buňkami a tím je aktivovat. Znak pro degranulaci $CD107a$ nám pomohl identifikovat

cytotoxickou aktivitu T-lymfocytů po aktivaci antigenem, jelikož degranulace je nezbytným prekurzorem pro úspěšnou cytotoxicitu (Betts et al. 2003).

Znakem pacientů, kteří kontrolovali CMV reaktivaci je polyfunkční odpověď $CD8^+$ T-buněk, které jsou charakterizovány duální produkcí $INF-\gamma$ a $IL-2$ ve stejné době. Serostatus dárce a příjemce ovlivňuje kontrolu CMV reaktivity, což souhlasí i s ostatními pracemi (např. Storek et al. 2008), ale analýzy ostatních klinických faktorů jako je čas po transplantaci, GvHD a jiné, nám neukázaly vliv na kontrolu CMV reaktivity. Dále jsme potvrdili a rozšířili pozorování Lilleriho et al. (2008), kteří prokázali vztah mezi duální produkcí $INF-\gamma$ a $IL-2$ na $CD8^+$ T-buňkách a ochranou funkcí před CMV reaktivací na menší kohortě pacientů. Tyto duální polyfunkční T-buňky byly již dříve popsány jako potenciálně zodpovědné za kontrolu infekcí (Pantaleo & Harari 2006), které jsou častější u pacientů s HIV, než jsou dlouhodobě neprogresivní (Zimmerli et al. 2005) a chybí u pacientů s progresivním HIV (Nomura et al. 2006). Ztráta T-lymfocytů s duální produkcí $INF-\gamma$ a $IL-2$ a vytrvalost pouze $INF-\gamma$ produkujících T-lymfocytů byla pozorována ve vyčerpaných LCMV-specifických T-buňkách při vysokých virových náložích u myší (Wherry et al. 2003), u kterých byl $IL-2$ velice citlivý na negativní regulaci během chronických infekcí. Důležitost duální produkce $INF-\gamma$ a $IL-2$ byla potvrzena u HIV pozitivních pacientů, u kterých infekce dlouhodobě nepostupuje, jelikož tyto duální $CD8^+$ buňky se nachází v oddílu pro centrální paměťové buňky imunitního systému a mohou tak proliferovat v závislosti na stimulaci $IL-2$ nezávisle na přítomnosti $CD4^+$ T-buněk (Zimmerli et al. 2005). Již dříve bylo objeveno, že proliferační schopnosti CMV-specifických T-buněk jsou spojeny s ochranou proti CMV virémii nebo nemoci (Barron et al. 2009). Jiné práce ale ukazují, že produkce pouze $INF-\gamma$ může být znakem funkčního vyčerpání virus-specifických T-buněk během chronické virové infekce (Ozdemir et al. 2002, Wherry et al. 2007).

Jak je vidět i z našich výsledků, v mnoha studiích, které se soustředily pouze na měření jednotlivých cytokinů a vybraly si $INF-\gamma$, nebylo možno odlišit neefektivní produkci pouze $INF-\gamma$ od efektivní duální odpovědi (Gratama et al. 2008, Guérin et al. 2010). Podobné omezení pak bude platit i u výsledků Bundeho et al. (2005), kteří neukazují žádný vztah mezi stimulací $CD8^+$ T-lymfocytů pomocí pp65 a protekcí, zatímco $CD8^+$ T-lymfocytům stimulovaným pomocí IE-1 přisuzují protektivní funkci. Do našeho stimulačního koktejlu

peptidů jsme zahrnuli oba fondy peptidů jak pp65 tak IE-1, abychom ukázali širokou odpověď na CMV antigeny. Do jisté míry může být absence tohoto vztahu k protekci způsobena tím, že monitorují pouze INF- γ produkující T-buňky a nezohledňují buňky duálně produkující INF- γ a IL-2.

Hodnocení vlivu virové nálože na charakteristickou odpověď u lidí je náročné. Přesto se nám podařilo srovnat pacienty s nedávnou vysokou hladinou CMV virové nálože a pacienty s nízkou hladinou CMV v krvi, kteří kontrolují chronickou infekci CMV. Toto srovnání nám pomohlo rozlišit znaky nedávno aktivovaných a dlouhodobě žijících paměťových T-buněk.

Cílem klinického monitorování obnovy CMV-specifické imunity je umožnit pomoc při klinickém rozhodování se o tom, zda pacientovi odložit či neodložit podání preemptivní léčby. Odložení léčby by mohlo pomoci pacientům, jejichž imunita se úspěšně obnovila. Toto bylo uskutečněno v malé studii, kdy byla preemptivní léčba odložena u pacientů, kteří měli CMV specifické CD8⁺ a CD4⁺ T-lymfocyty produkující INF- γ a zároveň u nich došlo k reaktivaci CMV. Tyto faktory byly posouzeny zkušeným hematologem (Avetisyan et al. 2007). Ideálně bychom chtěli vytvořit a nastavit reprodukovatelná kritéria, která by mohla být vnesena do léčebných protokolů. V této práci předkládám několik faktorů, které musí být vyhodnoceny současně, aby mohly předpovídat protekci proti CMV reaktivaci. V současné době máme provedeno přes 600 stanovení CMV-specifické produkce cytokinů na T-lymfocytech u 89 pacientů, tato data budou sloužit pro zevrubnou analýzu faktorů a pro návrh úpravy léčebného schématu.

5.2. Degranulace

Test degranulace jsme vytvořili pro potřeby rychlého a relativně jednoduchého stanovení degranulace NK-buněk u pacientů, kteří vykazují klinické známky NK-buněčného deficitu. Ke stanovení míry degranulace NK-buněk jsme použili myeloidní buněčnou linii buněk K562, která, jak se ukázalo ve shodě s Alterem et al. (2004), je schopna stimulovat NK-buňky k tomu aby degranulovaly. Stejně jako Alter et al. (2004) jsme prokázali, že znak CD107a je dostatečně senzitivním znakem a na základě míry jeho exprese na povrchu NK-buněk je možné usuzovat na míru jejich aktivace. Podařilo se nám test zoptimalizovat pro snadné a rychlé použití, tak abychom byli schopni získat výsledky ještě v den stimulace.

V současné době jsme tento test použili u tří pacientů, kdy u jednoho pacienta vyšla degranulace NK-buněk pozitivně a tudíž jsme mohli vyloučit defekt v degranulaci. U zbylých dvou pacientů degranulace vyšla v jednom případě jasně negativně a v jednom případě hraničně negativně, takže jsme spolu s vyšetřením na deficit v perforinu u T- a NK-buněk mohli doporučit pacienty k transplantaci hematopoetických krevních buněk (podobně jako Špíšek et al. 2006). Takovéto testování degranulace NK-buněk má své opodstatnění i po transplantaci, jelikož jsme schopni pozorovat, zda nedochází k relapsu původního onemocnění. V současné době očekáváme, že tento test využijeme u 10-12 pacientů ročně, přičemž pozitivní průkaz poruchy degranulace očekáváme u 2-3 pacientů za rok, jelikož se jedná o vzácné vrozené onemocnění s incidencí 1:50 000 (Špíšek et al. 2006).

5.3. Cytotoxicita

V poslední části práce jsme vyvíjeli cytotoxický test za účelem přesnějšího stanovení cytotoxicity NK-buněk. Dokázali jsme, že jsme schopni účinně testovat schopnosti NK-buněk zabíjet buňky K562. Na rozdíl od Kasatoriho et al. (2005) nejsme schopni detekovat jednotlivá stádia postupného zvětšování propustnosti plazmatických membrán, jelikož nezkoumáme uvolňování 2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5-(a-6)-karboxyfluoresceinu (BCECF) z buněk. Ale i bez této fluorescenční značky vidíme pomocí scattrů postupnou dezintegraci plazmatických membrán stejně jako Zamai et al. (1998). Výsledkem tohoto testu je důkaz, že NK-buňky opravdu zabíjí buňky K562 a že jejich cytotoxická aktivita je úzce spojena s kontaktem mezi NK-buňkami a buňkami K562. Cytotoxický test jsme vzhledem k problémům s jeho optimalizací neměli možnost vyzkoušet u konkrétních pacientů. V budoucnosti plánujeme jeho využití jako další doplnění informací o schopnosti NK-buněk cíleně zabíjet cílové buňky. Spolu s degranulačním testem nám pak poskytne kompletní informaci nejen o schopnostech NK-buněk tvořit cytotoxická granula, ale zároveň zjistíme, zda jsou tato granula opravdu funkční a mají schopnost zabíjet cílové buňky. Nefunkčnost každé funkce zvlášť pak může ukazovat na možné mutace v různých genech, které jsou za tyto funkce odpovědné (Baker et al. 1994). Stejně jako u degranulačního testu očekáváme použití testu cytotoxicity u 10-12 pacientů za rok s pozitivním výsledkem poruchy cytotoxicity u 2-3 pacientů.

6. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá sledováním funkčních odpovědí na T-lymfocytech, které byly stimulovány CMV antigeny. Výsledky navazují a dále prohlubují dosavadní znalosti o specifické odpovědi u T-lymfocytů. Podařilo se nám najít takové T-lymfocytární funkční znaky, které mohou spolu s dalšími klinickými faktory sloužit pro predikci vývoje CMV nemoci u imunokompromitovaných pacientů. Zjistili jsme, že nejdůležitějším prognostickým znakem je duální produkce INF- γ a IL-2 na CD8⁺ T-lymfocytech. Ostatní funkční odpovědi diskutujeme také, ovšem podle našich závěrů jim nelze přisuzovat takovou prognostickou hodnotu vzhledem k budoucímu vývoji CMV nemoci.

Dále diplomová práce ukazuje, že u pacientů po HSCT dochází k funkční specifické obnově T-lymfocytů nejdříve kolem devadesátého dne po transplantaci. V časnějších bodech po transplantaci se T-lymfocyty nevyskytují vůbec, nebo nejsou schopny dostatečné odpovědi. Abychom získali kompletní informaci o funkční obnově T-lymfocytární odpovědi, je zapotřebí dále zanalyzovat nesespecificky stimulované odpovědi T-lymfocytů. Tato analýza nám poskytne další informace o celkové obnově T-lymfocytární odpovědi.

Imunitní odpověď proti virům není zprostředkována pouze T-lymfocyty, ale účastní se jí i složky vrozené imunity hlavně pak NK-buňky. Testy degranulace a cytotoxicity, které jsme v této práci vyvinuli, slouží zatím při diagnóze NK-buněčných genetických poruch. Jejich využití je ovšem možné i při posttransplantačním testování funkčnosti NK-buněk a sledování jejího vývoje v jednotlivých časových bodech po transplantaci.

Vzhledem k rozvoji transplantačních programů a dalších získaných imunodeficitů je pravděpodobné, že metody monitorování imunity budou v blízké budoucnosti klinickými pracovišti vyžadované pro stále větší počet pacientů. Námi použitá metoda pozorování funkčních odpovědí T-lymfocytů a NK-buněk se zdá být pro tyto účely vhodná. Pro širší použití by bylo vhodné tuto metodu zjednodušit, či ji částečně zrobotizovat, o což se v současné době také snažíme. Zároveň pracujeme na obdobném testu pro EBV specifické lymfocyty, plánujeme testování BK-virus specifických a Adenovirus-specifických odpovědí. Funkční monitoraci virus-specifických buněk bychom rádi využili i v budoucnosti při léčebných aplikacích selektovaných, virus-specifických buněk od dárce pro příjemce, u kterého je obnova anti-virové imunity zcela nedostatečná.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alter, G., Malenfant, J. M., and M. Altfeld, 2004: CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods* 294, 15-22

Annane, D., Bellissant, E., Bollaert, P. E., Briegel, J., Confalonieri, M., De Gaudio, R., Keh, D., Kupfer, Y., Oppert, M., and G. U. Meduri, 2009: Corticosteroids in the Treatment of severe Sepsis and Septic Shock in Adults. *Journal of the American Medical Association* 31, 2362-2375

Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M., Papagno, L., Ogg, G. S., King, A., Lechner, F., Spina, C. A., Little, S., Havlir, D. V., Richman, D. D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A. J., and S. L. Rowland-Jones, 2002: Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine* 8, 379-385

Appay, V., Douek, D. C., and D. A. Price, 2008: CD8⁺ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nature Medicine* 14, 623-628

Avetisyan, G., Aschan, J., Hägglund, H., Ringdén, O., and P. Ljungman, 2007: Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplantation* 40, 865-869

Badovinac, V. P., Porter, B.B., and J.T. Harty, 2002: Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nature Immunology* 3, 619-626

Badovinac, V. P., Hamilton, S. E., and J. T. Harty, 2003: Viral Infection Results in Massive CD8⁺ T Cell Expansion and Mortality in Vaccinated Perforin-Deficient Mice. *Immunity* 18, 463-474

Baker, E., Sayers, T. J., Sutherland, G. R., and M. J. Smyth, 1994: The genes encoding NK cell granule serine proteases, human tryptase-2 (TRYP2) and human granzyme A (HFSP), both map to chromosome 5q11-q12 and define a new locus for cytotoxic lymphocyte granule tryptases. *Immunogenetics* 40, 235-237

Baldanti, F., Lilleri, D., and G. Gerna, 2008: Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Journal of Clinical Virology* 41, 237-241

Barron, M. A., Gao, D., Springer, K. L., Patterson, J. A., Brunvand, M. W., McSweeney, P. A., Zeng, C., Barón, A. E., and A. Weinberg, 2009: Relationship of reconstituted adaptive and innate cytomegalovirus (CMV)-specific immune responses with CMV viremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* 49, 1777-1783

Berger, M., 2008: Principles of and advances in immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 28, 413-437

- Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M., and R. A. Koup, 2003: Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods* 281, 65-78
- Betts, M. R., Nason, M. C., West, S. M., De Rosa, S. C., Migueles, S. A., Abraham, J., Lederman, M. M., Benito, J. M., Goepfert, P. A., Connors, M., Roederer, M., and R. A. Koup, 2006: HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 107, 4781-4789
- Bigos, M., Baumgarth, N., Jager, G. C., Herman, O. C., Nozaki, T., Stovel, R. T., Parks, D. R., and L. A. Herzenberg, 1999: Nine color eleven parameter immunophenotyping using three laser flow cytometry. *Cytometry* 36, 36-45
- Black, R.E., Allen, L. H., Bhutta, Z. A., Caulfield, L. E., De Onis, M., Ezzati, M., Mathers, C., and J. Rivera, 2008: Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *The Lancet* 371, 243-260
- Boeckh, M., and P. Ljungman, 2009: How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 113, 5711-5719
- Booth, C., Hershfield, M., Notarangelo, L., Buckley, R., Hoening, M., Mahlaoui, N., Cavazzana-Calvo, M., Aiuti, A., and H. B. Gaspar, 2007: Management options for adenosine deaminase deficiency; proceedings of the EBMT satellite workshop (Hamburg, March 2006). *Clinical Immunology* 123, 139-147
- Brown, M. G., Dokun, A. O., Heusel, J. W., Smith, H. R., Beckman, D. L., Blattenberger, E. A., Dubbelde, C. E., Stone, L. R., Scalzo, A. A., and W. M. Yokoyama, 2001: Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934-937
- Bunde, T., Kirchner, A., Hoffmeister, B., Habedank, D., Hetzer, R., Cherepnev, G., Proesch, S., Reinke, P., Volk, H. D., Lehmkuhl, H., and F. Kern, 2005: Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 201, 1031-1036
- Catalfamo, M., and P. A. Henkart, 2003: Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Current Opinion in Immunology* 15, 522-527
- Clark, R., and G. M. Griffiths, 2003: Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Current Opinion in Immunology* 15, 516-521
- Conley, M. E., Rohrer, J., and Y. Minegishi, 2000: X-linked agammaglobulinemia. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* 19, 183-204
- Cornelissen, J., 2004: Hematopoietic reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. In: Atkinson, K. A., Champlin, R., Ritz, J., Fibbe, W. E., Ljungman, P., and M. K. Brenner (Eds): *Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation*. Cambridge University Press, Cambridge, 160-190

de Saint Basile, G., and A. Fischer, 2001: The role of cytotoxicity in lymphocyte homeostasis. *Current opinion in immunology* 13, 549-554

Dulphy, N., Haas, P., Busson, M., Belhadj, S., Peffault de Latour, R., Robin, M., Carmagnat, M., Loiseau, P., Tamouza, R., Scieux, C., Rabian, C., Di Santo, J. P., Charron, D., Janin, A., Socie, G., and A. Toubert, 2008: An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Immunology* 181, 2227-2237

Dumont-Girard, F., Roux, E., Van Lier, R. A., Hale, G., Helg, C., Chapuis, B., Starobinski, M., and E. Roosnek, 1998: Reconstitution of the T cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood* 92, 4464-4471

Eckschlager, T. a kolektiv, 1999: *Průtoková cytometrie v klinické praxi*, Grada Publishing, Praha

Engelhard, D., Weinberg, M., Or, R., Shaked, O., Naparstek, E., Haikin, H., Slavin, S., and I. Sarov, 1991: Immunoglobulins A, G, and M to cytomegalovirus during recurrent infection in recipients of allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Infectious Diseases* 163, 628-630

Fadeel, B., Zhivotovsky, B., and S. Orrenius, 1999: All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 1647-1657

Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachée-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A., and G. de Saint Basile, 2003: Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell* 115, 461-473

Ferrari, S., Giliani, S., Insalaco, A., Al-Ghoniaim, A., Soresina, A. R., Loubser, M., Avanzini, M. A., Marconi, M., Badolato, R., Ugazio, A. G., Levy, Y., Catalan, N., Durandy, A., Tbakhi, A., Notarangelo, L. D., and A. Plebani, 2001: Mutations of *CD40* gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 12614-12619

Fischer, A., 2004: Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nature Immunology* 5, 23-30

Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., and J. M. Puck, 1995: Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946

Fulwyler, M. J., Glascock, R. B., and R. D. Hiebert, 1969: Device which separates minute particles according to electronically sensed volume. *Review of Scientific Instruments* 40, 42-48

- Gamadia, L. E., Rentenaar, R. J., van Lier, R. A., and I. J. ten Berge, 2004: Properties of CD4⁽⁺⁾ T cells in human cytomegalovirus infection. *Human Immunology* 65, 486-492
- Gandhi, M. K., Wills, M. R., Okecha, G., Day, E. K., Hicks, R., Marcus, R. E., Sissons, J. G., and A. J. Carmichael, 2003: Late diversification in the clonal composition of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood* 102, 3427-3438
- Gerritsen, E. J. A., Van Tol, M. J. D., Lankester, A. C., Van der Weijden-Ragas, C. P. M., Jol-van der Zijde, C. M., Oudeman-Gruber, N. J., Radl, J., and J. M. Vossen, 1993: Immunoglobulin levels and monoclonal gammopathies in children after bone marrow transplantation. *Blood* 82, 3493-3502
- Ghanekar, S. A., Nomura, L. E., Suni, M. A., Picker, L. J., Maecker, H. T., and V. C. Maino, 2001: Gamma interferon expression in CD8⁽⁺⁾ T cells is a marker for circulating cytotoxic T lymphocytes that recognize an HLA A2-restricted epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein pp65. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 628-631
- Goldrath, A. W., and M. J. Bewan, 1999: Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262
- Gratama, J. W., van Esser, J. W., Lamers, C. H., Tournay, C., Löwenberg, B., Bolhuis, R. L., and J. J. Cornelissen, 2001: Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 98, 1358-1364
- Gratama, J. W., Brooimans, R. A., van der Holt, B., Sintnicolaas, K., van Doornum, G., Niesters, H. G., Löwenberg, B., and J. J. Cornelissen, 2008: Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp65-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations. *Cytometry Part B Clinical Cytometry* 74, 211-220
- Guérin, V., Dalle, J. H., Pédrón, B., Ouachée-Chardin, M., Yakouben, K., Baruchel, A., and G. Sterkers, 2010: Cellular immune parameters associated with spontaneous control of CMV in children who underwent transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 45, 442-449
- Hakim, F. T., Memon, S. A., Cepeda, R., Jones, E. C., Chow, C. K., Kasten-Sportes, C., Odom, J., Vance, B. A., Christensen, B. L., Mackall, C. L., and R. E. Gress, 2005: Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *Journal of Clinical Investigation* 115, 930-939
- Hakki, M., Riddell, S. R., Storek, J., Carter, R. A., Stevens-Ayers, T., Sudour, P., White, K., Corey, L., and M. Boeckh, 2003: Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood* 102, 3060-3067

Harari, A., Dutoit, V., Cellerai, C., Bart, P.-A., DuPasquier, R. A., and G. Pantaleo, 2006: Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunological Review* 211, 236-254

Henter, J. I., Arico, M., Elinder, G., Imashuku, S. and G. Janka, 1998: Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *hematology /Oncology Clinics of North America* 12, 417-433

Chalandon, Y., Degermann, S., Villard, J., Arlettaz, L., Kaiser, L., Vischer, S., Walter, S., Heemskerk, M. H., van Lier, R. A., Helg, C., Chapuis, B., and E. Roosnek, 2006: The pre-transplant CMV-specific T-cells protect recipients of T-cell depleted grafts against cytomegalovirus related complications. *Blood* 187, 389-396

Chapel, H., Geha, R., and F. Rosen, 2003: Primary immunodeficiency diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology* 132, 9-15

Chen, C., Busson, M., Rocha, V., Appert, M. L., Lepage, V., Dulphy, N., Haas, P., Socié, G., Toubert, A., Charron, D., and P. Loiseau, 2006: Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplantation* 38, 437-444

Chklovskaya, E., Nowbakht, P., Nissen, C., Gratwohl, A., Bargetzi, M., and A. Wodnar-Filipowicz, 2004: Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood* 103, 3860-3868

Jakubowski, A. A., Small, T. N., Young, J. W., Kernan, N. A., Castro-Malaspina, H., Hsu, K. C., Perales, M. A., Collins, N., Cisek, C., Chiu, M., van den Brink, M. R., O'Reilly, R. J., and E. B. Papadopoulos, 2007: T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood* 110, 4552-4559

Jameson, S. C., 2002: Maintaining the norm: T-Cell homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 2, 547-556

Jenkins, M. K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D. L., McSorley, S. J., Reinhardt, R. L., Itano, A., and K. A. Pape, 2001: In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annual Review of Immunology* 19, 23-45

Jonuleit, H., Adema, G., and E. Schmitt, 2003: Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation. *Transplant Immunology* 11, 267-276

Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., and C. Rieger, 1993: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 159, 197-207

Kasatori, N., Ishikawa, F., Ueyama, M., and T. Urayama, 2005: A differential assay of NK-cell-mediated cytotoxicity in K562 cells revealing three sequential membrane

impairment steps using three-color flow-cytometry. *Journal of Immunological Methods* 307, 41-53

Kook, H., Goldman, F., Padley, D., Giller, R., Rumelhart, S., Holida, M., Lee, N., Peters, C., Comito, M., Huling, D., and M. Trigg, 1996: Reconstruction of the immune system after unrelated or partially matched T-cell-depleted bone marrow transplantation in children: immunophenotypic analysis and factors affecting the speed of recovery. *Blood* 88, 1089-1097

Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and M. H. van Oers, 1994: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420

Kotsiantis, S. B., 2007: Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques. *Informatica* 31, 249-268

Król, L., Stuchlý, J., Hubáček, P., Keslová, P., Sedláček, P., Starý, J., Hrušák, O., and T. Kalina, 2011: Signature profiles of CMV-specific T-cells in patients with CMV reactivation after hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* 46, 1089-1098

Kuijpers, T. W., Baars, P. A., Dantin, C., van den Burg, M., van Lier, R. A., and E. Roosnek, 2008: Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 112, 914-915

Kullback, S., and R. A. Leibler, 1951: On Information and Sufficiency. *Annals of Mathematical Statistics* 22, 79-86

Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W. J., Hill, A. V., and A. J. McMichael, 1997: Rapid effector function in CD8⁺ memory T cells. *Journal of Experimental Medicine* 186, 859-865

Leino, L., Lilius, E. M., Nikoskelainen, J., Pelliniemi, T. T., and A. Rajamaki, 1991: The reappearance of 10 differentiation antigens on peripheral blood lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 8, 339-344

Lilleri, D., Fornara, C., Chiesa, A., Caldera, D., Alessandrino, E. P., and G. Gerna, 2008: Human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell reconstitution in adult allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients and immune control of viral infection. *Haematologica* 93, 248-256

Limaye, A. P., Huang, M. L., Leisenring, W., Stensland, L., Corey, L., and M. Boeckh, 2001: Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *Journal of Infectious Diseases* 183, 377-382

Ljungman, P., Lewensohn-Fuchs, I., Hammarström, V., Aschan, J., Brandt, L., Bolme, P., Lönnqvist, B., Johansson, N., Ringdén, O., and G. Gahrton, 1994: Long-term immunity to measles, mumps, and rubella after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 84, 657-663

- Ljungman, P., 2008: CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation Supplement* 42, S70-S72
- Lucas, K. G., Small, T. N., Heller, G., Dupont, B., and R. J. O'Reilly, 1996: The development of cellular immunity to Epstein-Barr virus after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87, 2594-2603
- Mackall, C. L., Granger, L., Sheard, M. A., Cepeda, R., and R. E. Gress, 1993: T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 82, 2585-2594
- Mackall, C. L., Fleisher, T. A., Brown, M. R., Andrich, M. P., Chen, C. C., Feuerstein, I. M., Horowitz, M. E., Magrath, I. T., Shad, A. T., and S. M. Steinberg, 1995: Age, thymopoiesis, and CD4⁺ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *New England Journal of Medicine* 332, 143-149
- Mackall, C. L., Bare, C. V., Granger, L. A., Sharrow, S. O., Titus, J. A., and R. E. Gress, 1996: Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *Journal of Immunology* 156, 4609-4616
- Mackall, C. L., and R. E. Gress, 1997: Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunological Reviews* 157, 61-72
- Mackall, C. L., Hakim, F. T., and R. E. Gress, 1997: Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Seminars in Immunology* 9, 339-346
- Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianco, D., Fischer, A., Le Deist, F., and G. de Saint Basile, 2000: Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with hemophagocytic syndrome. *Nature Genetics* 25, 173-176
- Mikulska, M., Del Bono, V., Bruzzi, P., Raiola, A. M., Gualandi, F., Van Lint, M. T., Bacigalupo, A., and C. Viscoli, 2011: Mortality after bloodstream infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *Infection* [Epub ahead of print]
- Mir, M. A., and M. Battiwalla, 2009: Immune deficits in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. *Mycopathologia* 168, 271-282
- Morita-Hoshi, Y., Heike, Y., Kawakami, M., Sugita, T., Miura, O., Kim, S. W., Mori, S. I., Fukuda, T., Tanosaki, R., Tobinai, K., Y. Takaue, 2008: Functional analysis of cytomegalovirus-specific T lymphocytes compared to tetramer assay in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 41, 515-521
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and R. L. Coffman, 1986: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* 136, 2348-2357

- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., and T. Honjo, 1999: Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *Journal of Biological Chemistry* 274, 18470-18476
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and T. Honjo, 2000: Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* 102, 553-563
- Mutis, T., Verdim, R., Schrama, E., Esendam, B., Brand, A., and E. Goulmy, 1999: Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens. *Blood* 93, 2336-2341
- Nagata, S., 1999: Fas ligand-induced apoptosis. *Annual Review of Genetics* 33, 29-55
- Nakata, K., Gotoh, H., Watanabe, J., Uetake, T., Komuro, I., Yuasa, K., Watanabe, S., Ieki, R., Sakamaki, H., Akiyama, H., Kudoh, S., Naitoh, M., Satoh, H., and K. Shimada, 1999: Augmented proliferation of human alveolar macrophages after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 93, 667-673
- Nomura, L. E., Emu, B., Hoh, R., Haaland, P., Deeks, S. G., Martin, J. N., McCune, J. M., Nixon, D. F., and H. T. Maecker, 2006: IL-2 production correlates with effector cell differentiation in HIV-specific CD8⁺ T cells. *AIDS Research and therapy* 3, 18
- Notarangelo, L. D., and A. R. Hayward, 2000: X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (XHIM). *Clinical and Experimental Immunology* 120, 399-405
- Openshaw, P., Muchy, E. E., Hosken, N. A., Maino, V., Davis, K., Muchy, K., and A. O'Garra, 1995: Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1357-1367
- Ozdemir, E., St John, L. S., Gillespie, G., Rowland-Jones, S., Champlin, R. E., Molldrem, J. J., and K. V. Komanduri, 2002: Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 100, 3690-3697
- Pala, P., Hussell, T., and J. M. Openshaw, 2000: Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Journal of Immunological Methods* 243, 107-124
- Pantaleo, G., and A. Harari, 2006: Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nature Reviews Immunology* 6, 417-423
- Paredes-Aguilera, R., Romero-Guzman, L., Lopez-Santiago, N., Burbano-Ceron, L., Camacho-Del Monte, O., and S. Nieto-Martinez, 2001: Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in the diagnosis of acute leukemia. *American Journal of Hematology* 68, 69-74

- Rathmell, J.C., and C. C. Goodnow, 1995: Autoimmunity. The Fas track. *Current Biology* 5, 1218-1221
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Lagelouse, R., Gennery, A., Tetan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., and A. Durandy, 2000: Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565-575
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A., and J. P. de Villartay, 1995: Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349
- Rommeley, M., Spies-Weisshart, B., Schilling, K., Hochhaus, A., Sayer, H. G., and S. Scholl, 2011: Reconstitution and functional analyses of neutrophils and distinct subsets of monocytes after allogeneic stem cell transplantation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137, 1293-1300
- Roux, E., Abdi, K., Speiser, D., Helg, C., Chapuis, B., Jeannet, M., and E. Roosnek, 1993: Characterization of mixed chimerism in patients with chronic myeloid leukemia transplanted with Tcell-depleted bone marrow: involvement of different hematologic lineages before and after relapse. *Blood* 81, 243-248
- Roux, E., Helg, C., Chapuis, B., Jeannet, M., and E. Roosnek, 1996: T-cell repertoire complexity after allogeneic bone marrow transplantation. *Human Immunology* 48, 135-138
- Roux, E., Dumont-Girard, F., Starobinski, M., Siegrist, C.-A., Helg, C., Chapuis, B., and E. Roosnek, 2000: Recovery of immune reactivity after T cell depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood* 96, 2299-2303
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and A. Velardi, 1999: Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94, 333-339
- Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., Aversa, F., Martelli, M. F., and A. Velardi, 2007: Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Oncology* 19, 142-147
- Sander, B., Andersson, J., and U. Andersson, 1991: Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunological Review* 119, 65-93
- Seder, R. A., Darrah, P. A., and M. Roedere, 2008: T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nature Reviews Immunology* 8, 247-258

- Seggewiss, R., and H. Einsele, 2010: Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood* 115, 3861-3868
- Schmitz, J., Assenmacher, M., and A. Radbruch, 1993: Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology* 23, 191-199
- Scholl, S., Hanke, M., Höffken, K., and H. G. Sayer, 2007: Distinct reconstitution of neutrophil functions after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 133, 411-415
- Smolewski, P., Grabarek, J., Halicka, D. H., and Z. Darzynkiewicz, 2002: Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *Journal of Immunological Methods* 265, 111-121
- Stiehm, E. R., Ochs, H. D., Winklestein, J. A., and E. Rich, 2004: *Immunologic Disorders in Infants and Children*. Elsevier, New York.
- Stepp, S.E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F., Bhawan, S., Certain, S., Mathew, P. A., Henter, J. I., Bennett, M., Fischer, A., de Saint Basile, G., and K. Vinay, 1999: Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 286, 1957-1959
- Storek, J., Ferrara, S., Ku, N., Giorgi, J. V., Champlin, R. E., and A. Saxon, 1993: B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplantation* 12, 387-398
- Storek, J., Witherspoon, R. P., and R. Storb, 1995: T cell reconstitution after bone marrow transplantation into adult patients does not resemble T cell development in early life. *Bone Marrow Transplantation* 16, 413-425
- Storek, J., Gooley, T., Siadak, M., Bensinger, W. I., Maloney, D. G., Chauncey, T. R., Flowers, M., Sullivan, K. M., Witherspoon, R. P., Rowley, S. D., Hansen, J., Storb, R., and F. R. Appelbaum, 1997: Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation May Be Associated With a High Risk of Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Blood* 90, 4705-4709
- Storek, J., Wells, D., Dawson, M. A., Storer, B., and D. G. Maloney, 2001a: Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 98, 489-491
- Storek, J., Dawson, M. A., Storer, B., Stevens-Ayers, T., Maloney, D. G., Marr, K. A., Witherspoon, R. P., Bensinger, W., Flowers, M. E., Martin, P., Storb, R., Appelbaum, F. R., and M. Boeckh, 2001b: Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 97, 3380-3389
- Storek, J., Zhao, Z., Lin, E., Berger, T., McSweeney, P. A., Nash, R. A., Akatsuka, Y., Metcalf, M. D., Lu, H., Kalina, T., Reindl, M., Storb, R., Hansen, J. A., Sullivan, K. M., Kraft, G. H., Furst, D. E., and D. G. Maloney, 2004: Recovery from and consequences of

severe iatrogenic lymphopenia (induced to treat autoimmune diseases). *Clinical Immunology* 113, 285-298

Storek, J., 2008: Immunological reconstitution after hematopoietic cell transplantation - its relation to the contents of the graft. *Expert Opinion on Biological Therapy* 8, 583-597

Storek, J., Geddes, M., Khan, F., Huard, B., Helg, C., Chalandon, Y., Passweg, J., and E. Roosnek, 2008: Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Seminars in Immunopathology* 30, 425-437

Suzuki, I., Milner, E. C., Glas, A. M., Hufnagle, W. O., Rao, S. P., Pfister, L., and C. Nottenburg, 1996: Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage in bone marrow transplant recipients: lack of somatic mutation indicates a maturational arrest. *Blood* 87, 1873-1880

Špišek, R., Mejstříková, E., Formánková, R., Žižková, H., Vávra, V., Hrušák, O., Šedivá, A., Sedláček, P., and J. Starý, 2006: Familiární hemofagocytující lymfohistiocytóza na podkladě deficitu perforinu úspěšně léčená transplantací hematopoetických kmenových buněk – první diagnostikovaný případ v České republice. *Časopis Lékařů českých* 145, 50-54

Tan, H.P., Kaczorowski, D. J., Basu, A., Unruh, M., McCauley, J., Wu, C., Donaldson, J., Dvorchik, I., Kayler, L., Marcos, A., Randhawa, P., Smetanka, C., Starzl, T. E., and R. Shapiro, 2006: Living Donor Renal Transplantation Using Alemtuzumab Induction and Tacrolimus Monotherapy. *American Journal of Transplantation* 6, 2409-2417

Tanaka, N., Kimura, H., Iida, K., Saito, Y., Tsuge, I., Yoshimi, A., Matsuyama, T., and T. Morishima, 2000: Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *Journal of Medical Virology* 60, 455-462

Tarpey, M. M., Wink, D. A., and M. B. Grisham, 2004: Methods for the detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 286, R431-R444

Van Parijs, L. and A. K. Abbas, 1998: Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-248

Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Ka-Ming Chan, F., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J. M., Straus, S. E., and M. J. Lenardo, 1999: Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98, 47-58

Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R., and R. Ahmed, 2003: Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *Journal of Virology* 77, 4911-4927

Wherry, E. J., Ha, S. J., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J. N., Barber, D. L., and R. Ahmed, 2007: Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27, 670- 684

Woods, N. B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C., and I. M. Verma, 2006: Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature* 440, 1123

Zakrzewski, J. L., Holland, A. M., and M. R. M. van den Brink, 2007: Adoptive precursor cell therapy to enhance immune reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Molecular Medicine* 85, 837-843

Zamai, L., Mariani, A. R., Zauli, G., Rodella, L., Rezzani, R., Manzoli, F. A., and M. Vitale, 1998: Kinetics of in vitro natural killer activity against K562 cells as detected by flow cytometry. *Cytometry* 32, 280-285

Zimmerli, S. C., Harari, A., Cellerai, C., Vallelian, F., Bart, P. A., and G. Pantaleo, 2005: HIV-1-specific IFN- γ /IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 7239-7244